

**Neuroblastome entstehen aus
Neuralleistenstammzellen**

Anna-Margarete Bohrer

**Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen**

**Klinik für Kinderheilkunde III
Universitätsklinikum Essen**

Neuroblastome entstehen aus Neuralleistenstammzellen

**Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen**

**Vorgelegt von
Anna-Margarete Bohrer
aus Bonn a.Rh.
2013**

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. J.H. Schulte

2. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. med. U. Sure

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Oktober 2013

In folgenden Publikationen sind Teile dieser Arbeit enthalten:

Es sei darauf hingewiesen, daß aus Gründen der Übersichtlichkeit nur dann eine Zitierung dieser Arbeiten erfolgt, wenn eine wörtliche Übernahme von Textpassagen aus den genannten Publikationen in der aktuellen Arbeit erfolgt oder der Bezug aus anderen Gründen besonders hervorgehoben werden soll, nicht aber, wenn diese Texte in sinngemäßer oder abgewandelter, d.h. auch übersetzter Form Eingang in diese Arbeit gefunden haben. Mein genauer Beitrag zu den u.g. Arbeiten wird in Kapitel 5 exakt spezifiziert.

A. Originalarbeiten

Pajtler K. *, **A. Bohrer***, J. Maurer, H. Schorle, A. Schramm, A. Eggert and J. H. Schulte (2010). "Production of chick embryo extract for the cultivation of murine neural crest stem cells." J Vis Exp (45).

(*beide Autoren sind gleichermaßen Erstautoren dieser Veröffentlichung)

Schulte, J. H., S. Lindner, **A. Bohrer**, J. Maurer, K. De Preter, S. Lefever, L. Heukamp, S. Schulte, J. Molenaar, R. Versteeg, T. Thor, A. Kunkele, J. Vandesompele, F. Speleman, H. Schorle, A. Eggert and A. Schramm (2013). "MYCN and ALKF1174L are sufficient to drive neuroblastoma development from neural crest progenitor cells." Oncogene **32**(8): 1059-65.

B. Vortrag

Anna M. Bohrer, Alexander Schramm, Jochen Maurer, Hubert Schorle, Kathy Astrahantseff, Angelika Eggert, Johannes H. Schulte
„Entstehen Neuroblastome aus Neuralleistenprogenitorzellen?“
XXII. Jahrestagung der Kind-Philipp-Stiftung für Leukämieforschung, Wilsede
2009

C. Poster

Anna M. Bohrer, Alexander Schramm, Jochen Maurer, Hubert Schorle, Kathy Astrahantseff, Angelika Eggert, Johannes H. Schulte
„MYCN führt zur Transformation von Neuralleistenstammzellen *in vitro* und *in vivo*“
Forschungstag der Medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen
(2008).

Widmung

meinen Eltern & Geschwistern

und

den Geschwistern & Eltern

unserer Patienten

**„Das einzige Wichtige im Leben
sind die Spuren von Liebe,
die wir hinterlassen,
wenn wir weggehen.“**

(Albert Schweitzer)

Inhaltsverzeichnis

- 1. Einleitung**
 - 1.1. Das Neuroblastom**
 - 1.1.1. Epidemiologie**
 - 1.1.2. Klinische Symptome und Diagnostik**
 - 1.1.3. Früherkennung**
 - 1.1.4. Zelluläre Pathogenese**
 - 1.1.5. Histopathologie**
 - 1.1.6. Molekulare Pathologie**
 - 1.1.7. Staging und Risikostratifizierung**
 - 1.1.8. Therapie und Prognose**
 - 1.2. Neuroblastomgenese**
 - 1.2.1. Integrales Pathogenesemodell**
 - 1.2.2. MYCN als zentraler Faktor der Neuroblastomgenese**
 - 1.2.3. Mausmodelle der Neuroblastomentstehung**
 - 1.2.4. Neuroblastomstammzellen**
 - 1.2.5. Stammzellen als Ziel der malignen Transformation**
 - 1.3. Neuralleistenstammzellen**
 - 1.3.1. Immortalisierte Neuralleistenzellen**
 - 1.3.2. Das MONC-1 Modell**
 - 1.3.3. Das JoMa1 Modell**
 - 1.4. Ziele der aktuellen Studie**
- 2. Material und Methoden**
 - 2.1. Material**
 - 2.1.1. Verwendete Zellkulturlösungen, Zusätze und Antibiotika**

- 2.1.2. Verwendete Chemikalien**
- 2.1.3. Verwendete Enzyme**
- 2.1.4. Verwendete Verbrauchsmaterialien**
- 2.1.5. Verwendete Lösungen und Puffer**
- 2.1.6. Verwendete Kits**
- 2.1.7. Verwendete Geräte**
- 2.1.8. Verwendete Oligonukleotide**
- 2.1.9. Verwendete Hühnereier**
- 2.1.10. Verwendete Zelllinien**
- 2.1.11. Verwendete Mauslinien**
- 2.1.12. Verwendete Software**
- 2.2. Methoden**
 - 2.2.1. Zellkultur**
 - 2.2.1.1. Herstellung von Hühnerembryonenextrakt**
 - 2.2.1.2. Herstellung von Neuralleistenstammzellmedium**
 - 2.2.1.3. Kultur von JoMa1 Neuralleistenstammzellen und deren Derivaten**
 - 2.2.1.4. Isolierung und Kultivierung von murinen Neuroblastomzelllinien**
 - 2.2.2. MTT-Proliferationsassay**
 - 2.2.3. DNA-Isolation**
 - 2.2.4. RNA-Isolation**
 - 2.2.5. Synthese von cDNA aus isolierter RNA mittels reverser Transkription**
 - 2.2.6. DNA- und cDNA-Amplifikation**
 - 2.2.7. Semiquantitative PCR**
 - 2.2.8. Quantitative Echtzeit-PCR**
 - 2.2.9. Agarose-Gelelektrophorese**

- 2.2.10. Präparation von Plasmid-DNA
- 2.2.11. Klonierung
- 2.2.12. Transfektion von JoMa1 Neuralleistenstammzellen
- 2.2.13. Transplantation von JoMa1 Neuralleistenstammzellen und deren Derivaten in Nacktmäuse
- 2.2.14. Herstellung von Gewebeschnitten aus experimentellen Tumoren
- 2.2.15. Echtzeit-Zellanalyse mittels Impedanzmessung
- 3. Ergebnisse
 - 3.1. Kultur und Transfektion von JoMa1 Neuralleistenstammzellen
 - 3.2. Immortalisierung von JoMa1 Neuralleistenstammzellen durch MYCN und ALK^{F1174L} *in vitro*
 - 3.3. Etablierung eines Mausmodells zur Untersuchung der Tumorphagenese mit transfizierten JoMa1 Neuralleistenstammzellen
 - 3.3.1. Tumorigenität von JoMa1-MYCN und JoMa1-ALK^{F1174L} *in vivo*
 - 3.3.2. Histopathologie der Tumoren abgeleitet von JoMa1-MYCN
 - 3.3.3. Expression von MYCN und ALK^{F1174L} in den experimentellen Tumoren
 - 3.4. Etablierung von Neuroblastomzelllinien aus den induzierten Tumoren
 - 3.4.1. Etablierung der NB-Zelllinien JoMa1-MYCN-T1 bis JoMa1-MYCN-T6, sowie JoMa1-ALK^{F1174L}-T1 und JoMa1-ALK^{F1174L}-T2
 - 3.4.2. Zunahme der Tumorigenität bei serieller Transplantation von JoMa1-MYCN und JoMa1-ALK^{F1174L}
 - 3.5. Proliferation der Neuroblastomzelllinien JoMa1-MYCN-T1 und JoMa1-MYCN-T2 in Abhängigkeit von N-Myc
- 4. Diskussion

- 4.1. MYCN und ALK^{F1174L} sind Neuroblastom-induzierende Onkogene
- 4.2. Verwendung von JoMa1 Neuralleistenstammzellen zur Untersuchung der Tumorigenität *in vivo*
- 4.3. Die serielle Transplantation von Tumoren weist auf die Bedeutung sekundärer Veränderungen hin
- 4.4. Das Wachstum der transformierten NB-Zellen ist abhängig von transformierenden Onkogenen
- 4.5. Verwendung des JoMa1 System zur schnellen Testung potentieller Neuroblastom-induzierender Onkogene
- 5. Zusammenfassung
 - Literaturverzeichnis
 - Abkürzungsverzeichnis
 - Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen
 - Danksagung
 - Lebenslauf
 - Erklärung zum Beitrag zu den zugrundeliegenden Arbeiten

1. Einleitung

1.1. Das Neuroblastom

Das Neuroblastom ist der häufigste solide extrakranielle Tumor des Kleinkindalters und zeichnet sich vor allen Dingen durch seine große biologische, sowie klinische Heterogenität aus (Cheung und Dyer 2013). So reicht der klinische Verlauf von schneller Tumorprogression und Metastasierung mit fatalem Ausgang trotz multimodaler Therapie bis hin zur Ausdifferenzierung oder sogar der spontanen, oftmals narbigen, Regression. Erstmals beschrieben wurde das Neuroblastom als Geschwulst der Nebenniere 1866 durch Virchow (Virchow 1865), der Begriff „Neuroblastom“ wurde 1910 durch Wright eingeführt (Wright 1910). Seit 1984 werden das maligne Neuroblastom und seine benignen, bzw. weniger aggressiven Derivate (Ganglioneurom und Ganglioneuroblastom), unter dem Begriff der neuroblastischen Tumoren (Shimada et al. 1984) eingeordnet. Bei den neuroblastischen Tumoren handelt es sich um embryonale Tumoren, deren Ursprungszelle die sympathikoadrenerge Vorläuferzelle der Neuralleiste ist. Entsprechend der Migration dieser sympathikoadrenergen Vorläuferzellen sind die verschiedenen Primärlokalisationen der neuroblastischen Tumoren vielseitig. Häufigste Manifestationsorte sind das Nebennierenmark und die abdominalen sympathischen Ganglien (Übersicht in (Brodeur 2003)).

1.1.1. Epidemiologie

Mit 8-10% aller kindlichen Krebserkrankungen ist das Neuroblastom der häufigste solide extrakranielle maligne Tumor des Kindesalters. Die Prävalenz beträgt 1:7000 Lebendgeborene, die Inzidenz 1,4 Erkrankungen auf 100.000

Kinder < 15 Jahre. Fast 90% der Neuroblastome werden im Säuglings- und Kleinkindesalter (unter 5 Lebensjahre) diagnostiziert (Pizzo et al. 2005). Lediglich in ca. 1% der Fälle finden sich Patienten im Adoleszenten- oder Erwachsenenalter. Trotz eines medianen Alters von 17,4 Monaten bei Diagnosestellung, ist eine zweigipflige Altersverteilung zu beobachten, mit einem Gipfel im ersten und einem im dritten Lebensjahr (Pizzo et al. 2005). Einen wichtigen Hinweis darauf, daß es sich bei der Ursprungszelle des Neuroblastoms um die sympathikoadrenerge Vorläuferzelle der Neuralleiste handelt, liefert die Tatsache, daß bei Autopsien von Säuglingen, deren Tod durch eine nicht tumorassoziierte Erkrankung eingetreten war, ein überraschend hoher Anteil sogenannter „*In-situ*-Neuroblastome“ dokumentiert wurde (Beckwith and Perrin 1963). Diese Beobachtung lieferte gleichzeitig den ersten Hinweis auf das Phänomen der spontanen Tumorregression des Neuroblastoms im Säuglingsalter. Ein familiäres Auftreten von Neuroblastomen (Maris 2002) ist äußerst selten. In den Studien der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) zeigte sich, daß unter ca. 2500 Neuroblastompatienten nur 15 Patienten mit familiären Neuroblastomen aus 7 Familien zu finden waren (0,3%, Berthold 2003).

1.1.2. Klinische Symptome und Diagnostik

Die häufigste Lokalisation des Neuroblastoms ist zwar mit 70% im Abdomen, jedoch finden sich auch 15-25% der Tumoren entlang des zervikalen und thorakalen Grenzstrangs (Gadner et al. 2006). Dies liefert einen weiteren Hinweis darauf, daß es sich bei der Ursprungszelle des Neuroblastoms um die sympathikoadrenerge Vorläuferzelle der Neuralleiste handelt.

Spezifische Erstsymptome des Neuroblastoms gibt es nicht. Es sind in der Regel vielfältige unspezifische Symptome, die in Allgemein- und Lokalsymptome unterschieden werden: Schmerzen (33%), Fieber (26%) und Gewichtsverlust (12%) zählen zu den Allgemeinsymptomen. Knochenschmerzen sind häufig das erste Zeichen eines in den Knochen, bzw. das Knochenmark, metastasierten Neuroblastoms. Bei ausgeprägtem Befall des Knochenmarks kommt es häufig zu Veränderungen des Blutbildes, insbesondere in Form einer Anämie oder einer Thrombozytopenie. Eine Querschnittssymptomatik als Lokalsymptom ist möglich, bedingt durch die häufig spezielle Lage des Tumors im Bereich des Grenzstranges in der Nähe der Neuroforamina. Oftmals wachsen die Tumoren dann sanduhrförmig durch die Neuroforamina bis in den Spinalkanal ein. Bei Tumoren im zervikalen Bereich kann es zu einer Horner-Trias (Miosis, Ptosis und Enophthalmus) kommen. Retrobulbär metastasierte Neuroblastome imponieren klinisch als uni- oder bilaterales Brillenhämatom. Hautmetastasen zeigen charakteristisch livide Verfärbungen. Hirnmetastasen können sich initial durch eine neurologische Symptomatik in Form von Krampfanfällen, Wesensveränderungen und Zeichen eines erhöhten Hirndruckes bemerkbar machen, dies ist sehr jedoch selten. Ebenfalls zwar selten, jedoch sehr charakteristisch, sind paraneoplastische Symptome: Das Opsoklonus-Myoklonus Syndrom imponiert durch Myoklonien von Rumpf und Extremitäten, Ataxie und Opsomyoklonie. Bei VIP Sekretion des Tumors kann es zu therapieresistenten Durchfällen kommen. Sekretion von Katecholaminen führt zu einer Hypertonie. Bei rund 20% der entdeckten neuroblastischen Tumoren handelt es sich um einen Zufallsbefund, beispielsweise als auffälliger Tastbefund bei einer abdominalen Untersuchung oder als Raumforderung bei

einer aus einem anderen Grunde durchgeführten bildgebenden Untersuchung. Neben entsprechender Bildgebung (MRT und Sonographie) umfasst die initiale Diagnostik die Untersuchung von Serum und Urin auf Abbauprodukte der von 90% der Neuroblastome gebildeten Katecholamine. Unspezifische Tumormarker im Serum sind LDH, Ferritin und NSE. Sehr spezifisch hingegen ist die ¹³¹MIBG-Szintigraphie, die sich, neben Knochenmarkpunktionen an mindestens 4 Stellen, im Rahmen des Stagings anschließt. Bei der ¹³¹MIBG-Szintigraphie kommt es zu einer Anreicherung von Metaiodobenzylguanidin (MIBG) in neurosekretorischen Granula chromaffiner Zellen. Reichert das Neuroblastom während der ¹³¹MIBG-Szintigraphie keinen Tracer an, kann zusätzlich eine Szintigraphie mit ⁹⁹Technetium zum Nachweis etwaiger Knochenmetastasen durchgeführt werden. Unverzichtbar zur histologischen Sicherung der Diagnose ist eine Biopsie. Diese wird nach Möglichkeit aus dem Primärtumor entnommen. Ist dies bei schwer kranken Kindern nicht möglich, können auch eine Metastase oder, bei Knochenmarkinfiltration von mehr als 60%, das Knochenmark biopsiert werden. Bei Diagnosestellung finden sich in ca. 50% der Fälle bereits Metastasen. Diese finden sich häufig in Leber, Knochenmark, Knochen, Haut und ZNS, hingegen nur selten in der Lunge (Schwab et al. 2003).

1.1.3. Früherkennung

Für die Früherkennung wurde sich zunutze gemacht, daß ein Großteil der Neuroblastompatienten im Urin Katecholaminmetaboliten ausscheidet. Eine sowohl kostengünstige, als auch wenig belastende Urinuntersuchung auf Katecholaminmetaboliten, kann zur Diagnose klinisch noch unauffälliger

Tumoren führen. Als in den USA, Japan und Deutschland und weiteren Ländern bei Säuglingen im Alter von 6 oder 12 Lebensmonaten entsprechende Früherkennungsprogramme durchgeführt wurden („Neuroblastom-Screening“), stieg die Prävalenz auf bis zu 1:2000 an. Aufgrund niedriger Tumorstadien und günstiger biologischer Tumoreigenschaften hatten die betroffenen Säuglinge insgesamt eine sehr gute Prognose. Prävalenz- und Inzidenzzunahme waren ganz offensichtlich durch eine Überdiagnose von Neuroblastomen bedingt, die ohne Screening unentdeckt geblieben wären und unbemerkt eine Spontanremission durchlaufen hätten. Durch das Screening-Programm konnte jedoch leider weder die Zahl biologisch aggressiver neuroblastischer Tumoren, noch die Inzidenz metastasierter Erkrankungen oder die bevölkerungsspezifische Letalität gesenkt werden (Schilling et al. 2002; Woods et al. 2002). Aus diesen Gründen besteht aus heutiger Sicht keine Indikation zur Durchführung des Neuroblastom-Screenings.

1.1.4. Zelluläre Pathogenese

Neuroblasten unreifer Neuroblastome erinnern morphologisch an unreife sympathoadrenerge Zellen, die während der embryonalen Entwicklung in die Nebenniere und in sympathische Ganglien einwandern und dort proliferieren. Zum Zeitpunkt der Geburt sind diese Zellen zum größten Teil bereits neuroendokrin (Nebennierenmark) oder ganglionär ausdifferenziert. Insbesondere im Nebennierenmark finden sich jedoch physiologischerweise Inseln neuroblastischer Zellproliferate. Diese Inseln wurden von Beckwith, in Abhängigkeit ihrer Ausdehnung, als „Neuroblastoma *in situ*“ bezeichnet. In Autopsieserien Neugeborener liegt die Prävalenz dieser Neuroblastoma *in situ*

bei 1:200, ohne, daß diese im späteren Verlauf als manifeste neuroblastische Tumoren in Erscheinung träten (Beckwith et al. 1963). Diese Beobachtungen führten zum Entwurf eines Modells, in dem Differenzierungshemmung und Differenzierungsverzögerung als zentrale Elemente der Pathogenese neuroblastischer Tumoren angesehen werden.

1.1.5. Histopathologie

Zusammen mit dem primitiv neuroektodermalen Tumor (PNET), dem Ewing Sarkom, dem Rhabdomyosarkom, Lymphomen und einigen anderen Tumoren wird das Neuroblastom histomorphologisch zu den ‚kleinen blauen rundzelligen‘ Tumoren gezählt. Bis vor etwa 15 Jahren wurde in Deutschland noch die Klassifikation nach Hughes verwendet, seit der Studie NB 2004 wird jedoch auch die „International Neuroblastoma Pathology Classification“ (INPC) (Shimada et al. 1999) verwendet. Diese basiert auf der Shimada Klassifikation (Shimada et al. 1984). Ausschlaggebend für die Klassifikation der neuroblastischen Tumoren sind der Stromagehalt, die Differenzierung der Neuroblasten („undifferentiated“, „poorly undifferentiated“, „differentiating“), sowie der Mitosis-Karyorhexis Index. Dieser Index bezeichnet die Anzahl der Mitosen bzw. Apoptosefiguren pro 5000 Zellen. Aus oben genannten Merkmalen ergibt sich in Abhängigkeit des Alters entweder eine günstige oder eine ungünstige Histologie.

1.1.6. Molekulare Pathologie

Es gibt eine Vielzahl molekularer Marker, die zusammen mit der INPC eine überragende klinische und prognostische Bedeutung haben. Im Gegensatz zu

diesen molekularen Markern, spiegeln die ‚klassischen‘ Serummarker wie LDH, NSE und Katecholaminkonzentration im Serum vorwiegend das Tumervolumen wider und erlauben lediglich sehr unspezifische prognostische Aussagen.

MYCN Amplifikation

Als eine der ersten Onkogen-Amplifikationen überhaupt wurde 1983 die Amplifikation des Onkogens MYCN in Neuroblastomzelllinien von M. Schwab aufgezeigt (Schwab et al. 1983). Ein Jahr später, 1984, konnte G. M. Brodeur nachweisen, daß MYCN Amplifikationen insbesondere in Neuroblastomen fortgeschrittener Stadien zu beobachten sind (Brodeur et al. 1984). Ein weiteres Jahr später, 1985, gelang es R. Seeger, die ungünstige prognostische Bedeutung der MYCN Amplifikation beim Neuroblastom aufzuzeigen (Seeger et al. 1985). Ungefähr 25% aller Neuroblastome weisen eine MYCN Amplifikation auf. Das Vorhandensein der Amplifikation selbst korreliert stärker mit der Prognose, als die Expression von MYCN auf mRNA- und Proteinebene (Tang et al. 2006). Es handelt sich bei N-Myc funktionell um einen Transkriptionsfaktor, der in der frühen Neurogenese exprimiert und danach nicht mehr gebildet wird. N-Myc reguliert zusammen mit seinen Co-Faktoren MAD und MAX die Expression von Genen, deren Genprodukte beispielsweise an Apoptose, Zellzyklussteuerung und Differenzierung beteiligt sind.

DNA Index

Auch mit Hilfe des DNA Gehalts der Tumorzellen lassen sich prognostische Aussagen bei Neuroblastompatienten treffen. Säuglinge, deren Tumoren einen triploiden DNA Gehalt besitzen, weisen häufiger niedrige Tumorstadien auf,

wohingegen ein diploider DNA Gehalt eher in Verbindung mit einer fortgeschrittenen Erkrankung steht (Look et al. 1984). Jedoch besteht bei aneuploiden Tumoren älterer Kinder eine höhere Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von strukturellen Veränderungen, beispielsweise in Form von Deletionen oder Genamplifikationen. Dies wird als möglicher Grund dafür angesehen, daß diese Patienten trotz Aneuploidie eine ungünstige Prognose haben (Look et al. 1991).

Deletion 1p36

Als häufigste Deletion im Neuroblastom ist die Deletion 1p36 mit einer schlechten Prognose verbunden. Bei den meisten Tumoren mit einem Verlust des Chromosoms 1p ist dieser mit einer gleichzeitigen Amplifikation des MYCN Gens und einem diploiden DNA Gehalt vergesellschaftet. Die betroffenen Patienten sind häufig älter als ein Jahr und befinden sich in einem fortgeschrittenen Erkrankungsstadium (Takeda et al. 1996). Es wird angenommen, daß sich an diesem Locus ein oder sogar mehrere noch unbekannte Tumorsuppressorgene befinden, deren Verlust oder Inaktivierung eine kritische Rolle für die Progression des Neuroblastoms spielen könnten (Maris et al. 1995; Brodeur et al. 1997).

Weitere Deletionen und Zugewinn 17q

Im Neuroblastom wurde eine Vielzahl weiterer Chromosomenaberrationen nachgewiesen. Meist sind die Bruchpunkte inkonsistent, es finden sich überwiegend Verluste von 3p oder 11q, 14q (Attiyeh et al. 2005). In rund 50% aller Neuroblastome findet sich zudem ein Zugewinn im Bereich des langen

Armes des Chromosoms 17, dieser Zugewinn geht ebenfalls mit einem unspezifischen Bruchpunkt einher. Eine Duplikation der 17q Region korreliert mit einer ungünstigen Prognose (Bown et al. 1999; Lastowska et al. 2001).

Expression von Neurotrophinrezeptoren

Von besonderer Bedeutung für das biologische Verhalten und die Prognose primärer Neuroblastome ist die unterschiedliche Expression verschiedener Mitglieder der Neurotrophinrezeptorfamilie. So korreliert die Expression des Neurotrophinrezeptors TrkA mit günstiger Tumorbilogie, niedrigem Erkrankungsstadium und guter Prognose (Nakagawara et al. 1993; Brodeur et al. 1997; Shimada et al. 2004), wohingegen die Expression des Neurotrophinrezeptors TrkB mit schlechter Prognose korreliert (Nakagawara et al. 1994).

ALK

Eine onkogene Aktivierung der anaplastischen Lymphomkinase (ALK) durch Translokation und Formation von Fusionsgenen wurde zunächst in B-Zellymphomen beschrieben (Morris 1994). Doch auch in anderen Malignitäten kommt es zu einer onkogenen Aktivierung von ALK, beispielsweise in nichtkleinzelligen Lungentumoren (Soda 2007). Eine Therapie mit dem ALK Inhibitor Crizotinib ist sehr effektiv im Rahmen der Behandlung dieser Tumoren (Kwak 2010; Butrynski 2010). Auch wurden aktivierende Mutationen des Onkogens ALK in fast allen familiären Fällen und in 10% aller sporadischen Neuroblastome beschrieben (Chen 2008; George 2008; Janoueix-Lerosey 2008; Mosse 2008). Die Mutation F1174L wird hierbei als die aggressivste Form

beschrieben. Gesicherte Liganden von ALK sind Pleiotrophin und Midkine, hierbei handelt es sich um eine eigenständige Gruppe von Heparin-bindenden Wachstumsfaktoren (Wellstein et al. 2012). Exprimiert wird ALK u.a. während der Entwicklung der sympathoadrenergen Linie der Neuralleiste (Iwahara et al. 1997; Degoutin et al. 2009). Es wird postuliert, daß ALK über diverse zelluläre Signalwege, so auch über die MAPK und RAP1 abhängigen Signaltransduktionswege, entscheidend das Verhältnis zwischen Proliferation und Differenzierung reguliert (Souttou et al. 2001; Motegi et al. 2004; Schonherr et al. 2010), (vergleiche Cheung und Dyer 2013).

1.1.7. Staging und Risikostratifizierung

Das Staging erfolgt nach dem International Neuroblastoma Staging System (INSS) (Evans et al. 1971; Brodeur et al. 1988; Brodeur et al. 1993), dieses stellt eine Anpassung der Evans-Klassifikation durch das internationale INSS-Komitee dar. Es werden die Stadien 1-4 unterschieden, wobei die Stadien 1, 2a und 2b begrenzte, hingegen Stadium 3, 4 und 4S fortgeschrittene, bzw. metastasierte Stadien darstellen (Tab.1). Dem Stadium 4S fällt eine besondere Bedeutung zu: Definitionsgemäß tritt es nur bei Kindern < 1 Lebensjahr auf. Es beinhaltet metastasierte Tumoren, die meist eine prominente Lebermetastasierung aufweisen, jedoch niemals Knochenmetastasen. Obgleich ihrer ausgeprägten Metastasierung weisen 4S Tumoren eine hohe Spontanheilungsrate auf und haben eine exzellente Prognose.

Stadium	Definition
Stadium 1	lokalisierter Tumor, komplette Resektion, Lymphknoten nicht befallen
Stadium 2a	lokalisierter Tumor, inkomplette Resektion, Lymphknoten nicht befallen
Stadium 2b	lokalisierter Tumor, inkomplette Resektion, ipsilaterale Lymphknoten befallen
Stadium 3	Tumorausbreitung über die Mittellinie oder Befall der kontralateralen Lymphknoten
Stadium 4	disseminierter Tumor
Stadium 4s	Kind <1 Jahr, lokalisierter Tumor, Metastasen in Leber und / oder Haut und / oder Knochenmark, keine Knochenmetastasen

Tab.1: Das Internationale Neuroblastom Staging System (INSS) ist eine Anpassung des Evans Staging System und umfasst die Stadien 1-4 sowie das Stadium 4S. Tabelle angepasst nach (Evans et al. 1971; Brodeur et al. 1988; Brodeur et al. 1993).

Zytogenetische und molekulare Studien weisen darauf hin, daß sich Neuroblastome in drei genetisch und biologisch unterschiedliche Tumortypen unterscheiden lassen (Tab.2, (Maris et al. 1999; Brodeur 2003)). Die erste, günstige Gruppe, ist charakterisiert durch hohe Expression des Neurotrophinrezeptors TrkA, einen hyperdiploiden Karyotyp, das Fehlen struktureller chromosomaler Veränderungen, ein niedriges Tumorstadium und eine gute Prognose. Die zweite, intermediäre Gruppe besteht aus fast-diploiden oder tetraploiden Tumoren mit niedriger TrkA Expression und strukturellen

Chromosomenaberrationen, jedoch ohne MYCN Amplifikation. Die dritte, ungünstige Gruppe, besteht aus hoch aggressiven, rasch progredienten Tumoren mit hoher Expression des Neurotrophinrezeptors TrkB, diploidem Chromosomensatz, MYCN Amplifikation, Deletion des Chromosoms 1p, sowie ausgeprägter chromosomaler Instabilität.

Eigenschaft	Typ I	Typ II	Typ III
MYCN	normal	normal	<u>amplifiziert</u>
DNA Ploidie	hyperdiploid	diploid / tetraploid	diploid / tetraploid
17q Zugewinn	selten	häufig	häufig
11q, 14q LOH	selten	häufig	selten
1p LOH	selten	selten	häufig
TrkA Expression	<u>hoch</u>	niedrig	niedrig
TrkB Expression	trunkiert	niedrig	<u>hoch</u>
Alter b. Diagnose	<1 J	>1 J	1 - 5 J
Stadium	1, 2, 4s	3, 4	3, 4
5J Überleben	95 %	40–50 %	25 %

Tab.2: Das Spektrum der neuroblastischen Tumoren umfasst mindestens drei biologisch klar abgrenzbare Erscheinungsformen des Neuroblastoms. Es wird diskutiert, ob und wann diese Formen ineinander übergehen können oder ob es sich um ätiologisch und pathogenetisch separate Krankheitsformen handelt (verändert nach (Marls et al. 1999; Brodeur 2003)).

Auch klinisch werden die neuroblastischen Tumoren in drei Risikogruppen unterteilt. Die Children's Oncology Group (COG) verwendet hierfür die Parameter

INSS-Stadium, Alter, MYCN Status, INPC und DNA Ploidität. Die Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) verwendet hingegen in der aktuellen Studie NB2004 Alter, Stadium, MYCN Status und 1p36 Deletion.

1.1.8. Therapie und Prognose

Neuroblastische Tumoren werden risikoadaptiert und multimodal behandelt. Im Rahmen der GPOH Studie NB2004 werden Patienten mit niedrigem Risiko nach der initialen Tumorresektion lediglich beobachtet, eine milde Chemotherapie wird nur bei lokalem Progress oder symptomatischem Tumor eingeleitet. Die Therapie der Patienten mittleren Risikos erfolgt in Form von Tumorresektion, Polychemotherapie, gegebenenfalls Bestrahlung und anschließender Therapie mit 13-cis Retinolsäure. Patienten der Hochrisikogruppe bedürfen einer multimodalen Therapie: Resektion, Es kommen Polychemotherapie, Strahlentherapie, Therapie mit 13-cis Retinolsäure, gefolgt von autologer Stammzelltransplantation zum Einsatz (Pizzo et al. 2011).

Im Stadium 1 und 2 liegt das 5 Jahres-Überleben der Patienten bei etwa 95-98%, im Stadium 3 und 4s bei 75-76%, wohingegen es im Stadium 4 nur noch bei 33% liegt (laut NB97 Studie). Insgesamt sind Neuroblastome die Ursache von rund 15% aller kindlichen Krebstodesfälle.

1.2. Neuroblastompathogenese

Die frühe Pathogenese des Neuroblastoms liegt nachwievor weitgehend im Dunkeln. Es wird vermutet, daß sich das Neuroblastom als Prototyp der embryonalen Tumoren aus Zellen der Neuralleiste entwickelt. Hierfür spricht das Verteilungsmuster der Tumoren: Häufigste Primärlokalisation ist das

Nebennierenmark, gefolgt von Lokalisationen entlang des Grenzstranges. Einen weiteren Hinweis auf Zellen der Neuralleiste als Ursprungszellen von Neuroblastomen liefern die sog. Neuroblastome *in situ*, die mit einer Frequenz von 1:200 auftreten und sich im Nebennierenmark befinden. Es handelt sich bei diesen Tumoren offensichtlich um Nester unvollständig differenzierter Sympathogonien (Beckwith et al. 1963). Über die tatsächliche Ursprungszelle des Neuroblastoms gibt es zahlreiche Theorien (Nakagawara et al. 2001). Neuere Theorien gehen davon aus, daß es sich bei der Ursprungszelle des Neuroblastoms um eine Neuralleistenstammzelle, bzw. eine Vorläuferzelle der sympathikoadrenergen Linie handelt. Es wurde postuliert, daß der Zeitpunkt der malignen Transformation für die spätere Tumorbilogie maßgeblich entscheidend ist und beispielsweise die Expression der prognostisch relevanten Trk-Rezeptoren determiniert. Beweise für diese theoretischen Erwägungen stehen jedoch noch aus (Maris et al. 1999). Die initiale Mutation der sporadischen Neuroblastome konnte noch nicht identifiziert werden. Auch konnte bislang keine Sequenz der regelmäßig im Neuroblastom beobachteten genetischen Alterationen etabliert werden.

1.2.1. Integrales Modell der Neuroblastompathogenese

Ein Modell der Neuroblastomentstehung beruht auf der Annahme, daß undifferenzierte Neuroblasten des sympathischen Nervengewebes Ziele für Mutationsereignisse sind, welche dann zur Tumorentstehung führen (Maris et al. 1999). Nach dieser Hypothese bestimmt der Differenzierungsgrad zum Zeitpunkt der malignen Transformation das Neurotrophin-Expressionsmuster (Abb. 1).

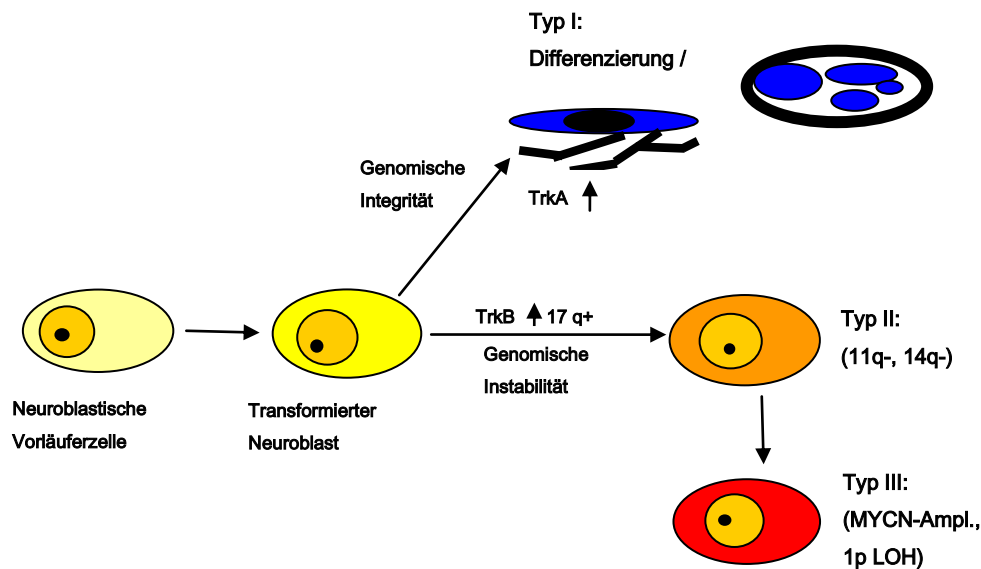


Abb.1: Biologisch-genetisches Modell der Entstehung biologisch unterschiedlicher Neuroblastom-Typen aus einer transformierten Vorläuferzelle. Den Tyrosinkinase-Rezeptoren TrkA und TrkB kommt in diesem Modell eine wesentliche pathogenetische Bedeutung zu, während die MYCN Amplifikation ein relativ spätes Ereignis darstellt (angepasst nach (Marris et al. 1999; Brodeur 2003)), (vergleiche (Schulte 2007)).

Tyrosinkinase A (TrkA) exprimierende Zellen können entweder differenzieren oder in die Apoptose übergehen. Tumoren dieser Gruppe entsprechen den prognostisch günstigen Typ I-Neuroblastomen. Tyrosinkinase B (TrkB) exprimierende Tumoren weisen genomische Instabilität auf, am häufigsten gekennzeichnet durch unbalancierte Translokationen des langen Arms von Chromosom 17 (Bown et al. 1999). Es scheint, daß der zusätzliche Verlust genetischen Materials auf den Chromosomen 11 und / oder 14 invers mit einer MYCN Amplifikation korreliert (Maris et al. 2001), (Thompson et al. 2001). Dieser Subtyp ist vorwiegend genetisch determiniert und beinhaltet die Typ II-Neuroblastome, deren Prognose bisher nicht sicher vorhergesagt werden kann.

Tumoren mit zusätzlichem Verlust von Chromosom 1p Material weisen dagegen häufig MYCN Amplifikationen und einen hochmalignen Phänotyp auf (Caron et al. 1996), sie werden als Typ III-Neuroblastome mit schlechter Prognose bezeichnet.

1.2.2. Mausmodelle der Neuroblastomgenese

Es stehen verschiedene Neuroblastom Mausmodelle zur Verfügung. Neben zahlreichen Xenograft Modellen, in denen humane Neuroblastomzelllinien subkutan in Nacktmäuse transplantiert werden, stehen mehrere transgene Modelle zur Verfügung. In diesen Modellen sind verschiedene Onkogene wie u.a. HRas, MYCN und SV40 unter neuralleistenspezifischen Promotoren exprimiert worden. Meist handelt es sich um den Tyrosinhydroxylase oder den Dopamin-beta-Hydroxylase-Promotor (Sweetser et al. 1997; Weiss et al. 1997).

Das am weitesten verbreitete Modell ist eine von Weiss et al. entwickelte Mauslinie, bei der N-Myc unter der Kontrolle des Tyrosinhydroxylase-Promotors exprimiert wird und in welcher sich mit hoher Penetranz neuroblastomähnliche Tumoren bilden (Weiss et al. 1997). Obgleich dieses Modell starke Hinweise dafür liefert, daß Neuroblastome aus Neuralleistenstammzellen entstehen, konnte auch hier der Ursprung der Neuroblastome nicht einer klar definierten Zellpopulation zugeordnet werden. Hinzu kommt, dass die Expression des Tyrosinhydroxylase-Promotors nicht streng auf die Neuralleiste beschränkt ist. So bildeten konditional K-ras transgene Mäuse, welche mit Mäusen verpaart wurden, die Cre-Rekombinase unter dem Tyrosinhydroxylase-Promotor exprimierten, Hautwarzen und keine Neuroblastome (Schulte et al., unpublizierte Daten).

1.2.3. Neuroblastomstammzellen

Es kann mittlerweile als erwiesen angesehen werden, daß zumindest einige Tumorentitäten sog. ‚Tumorstammzellen‘ enthalten, die zu unlimitierter Proliferation und Selbsterneuerung befähigt sind. Diese Tumorstammzellen teilen sich asymmetrisch und differenzieren in andere Zelltypen des Tumors, welche die Fähigkeit zur unbegrenzten Teilung verlieren (Burkert et al. 2006), (Abb.2).

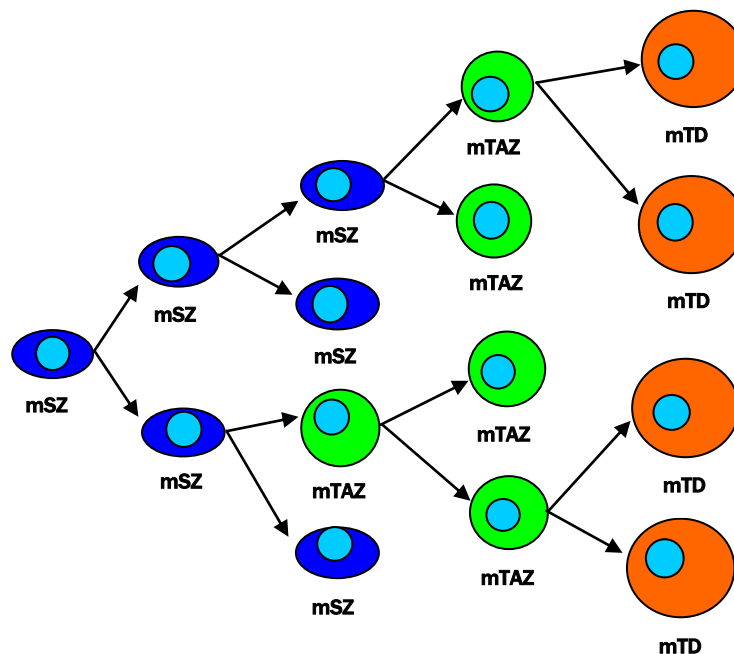


Abb.2: Die Generation der zellulären Heterogenität in einem Tumor. Dysregulation von asymmetrischer Zellteilung in einer malignen Stammzelle (mSZ) führt zu zunehmender Anzahl von malignen Stammzellen (mSZs). Zufällige Kombinationen von symmetrischen und asymmetrischen Teilungen produzieren maligne transient amplifizierende Zellen (mTAZ) mit limitiertem proliferativem Potential und maligne terminal differenzierte Zellen (mTD) ohne proliferatives Potential (angepasst nach (Burkert et al. 2006)).

Auch wenn diese Tumorstammzellen nur eine kleine Fraktion der Gesamtzellmasse des Tumors darstellen, sind sie kritisch für den Erhalt des

Tumors. Somit stellen sie „bona fide“ Zielzellen für eine rationale Tumorthherapie dar. Meist lassen sich diese Stammzellen anhand spezifischer Oberflächenmarker von anderen, differenzierten Tumorzellen, unterscheiden. Diese Oberflächenmarker sind oft ähnlich denen, die die physiologischen Stammzellen des Ursprungsgewebes charakterisieren. So weisen beispielsweise die Tumorstammzellen des Medulloblastoms den Oberflächenmarker CD133 auf, der auch von neuronalen Stammzellen exprimiert wird (Singh et al. 2003; Singh et al. 2004). Auch bei einer Chronisch Myeloischen Leukämie sind die Tumorstammzellen für denselben Oberflächenmarker positiv (CD34+) bzw. negativ (CD38-), entsprechend der physiologischen hämatopoetischen myeloischen Stammzellen (Burkert et al. 2006).

Im Neuroblastom steht der endgültige Nachweis einer Population von Tumorstammzellen noch aus.

1.2.5. Stammzellen als Ziel der malignen Transformation

Bereits im Jahr 1855 hat R. Virchow den ersten Zusammenhang zwischen Gewebeentwicklung und Tumorformation vermutet. Basierend auf histologischen Ähnlichkeiten zwischen dem sich entwickelnden Fetus und Tumoren, wie z.B. dem Teratokarzinom, hat er seine „embryonaler-Überrest-Hypothese“ zur Entstehung von Krebs aufgestellt. Er nahm an, daß Tumoren durch die Aktivierung von schlafendem residualem Gewebe entstünden (Virchow 1855). Seine These wird durch die Tatsache gestützt, daß in bestimmten Tumoren Zellhaufen, sog. Cluster, von abnormalen verbliebenen embryonalen Zellen, sowie mit Krebs assoziierte Mutationen, pränatal oder bei

Geburt gefunden werden können: Wilms-Tumor, Akute Lymphatische Leukämie (Beckwith et al. 1990; Wiemels et al. 1999). Der erste Nachweis der Existenz von Stammzellen erfolgte im hämatopoetischen System (McCulloch 2005). Unabhängig davon, ob sich die Tumorstammzellhypothese für alle Tumoren bewahrheitet, stellt sich die Frage, ob Tumoren aus differenzierten Geweben oder aus den Kompartimenten physiologischer Stammzellen entstehen. Die klassischen Modelle zur Karzinogenese beschreiben eine Dedifferenzierung der Ursprungszelle unter Akquirierung der krebszelltypischen Eigenschaften, der sog. „hallmarks of cancer“ (Hanahan and Weinberg 2000; Hanahan and Weinberg 2011) durch sequenzielle Akkumulation genetischer Alterationen. Im Gegensatz dazu muß bei der Tumorentstehung aus physiologischen Stammzellen ein grundlegend anderes Prinzip angenommen werden: Die undifferenzierten Stammzellen durchlaufen im Rahmen der malignen Transformation eine partielle Differenzierung im Sinne des resultierenden Tumortyps und sind *a priori* mit den meisten Eigenschaften einer Tumorzelle, wie beispielsweise Invasivität, Fähigkeit zur Migration ausgestattet. Eine einzige oder wenige genetische Alterationen können vor diesem Hintergrund zur Ausbildung eines Tumors führen.

Vor wenigen Jahren konnte dieses Konzept für das Ewing Sarkom, einen anderen embryonalen Tumor, belegt werden: Die Transfektion einer mesenchymalen Stammzelle mit dem Ewing Sarkom-typischen Fusionsgen EWS-FLI reichte zur Transformation aus. Es entstand eine *in vivo* tumorigene Zelle, die phänotypisch dem Ewing Sarkom entsprach (Riggi et al. 2008).

1.3. Neuralleistenstammzellen

Stammzellen sind definiert als pluripotente Vorläuferzellen mit der Fähigkeit zur Selbsterneuerung. Von allen Zellen in einem Gewebe besitzen sie zu einem bestimmten Zeitpunkt das größte Differenzierungspotential (Morrison et al. 1999). Die Neuralleiste geht aus dem Neuroektoderm hervor. In früheren Experimenten konnten multipotente Vorläuferzellen in der Neuralleiste identifiziert werden (Bronner-Fraser and Fraser 1988). Sowohl *in vivo* (Bronner-Fraser and Fraser 1988; Bronner-Fraser and Fraser 1989; Bronner-Fraser and Fraser 1991), als auch *in vitro* (Bronner-Fraser et al. 1980; Sieber-Blum and Cohen 1980; Baroffio et al. 1988; Stemple and Anderson 1992; Ito et al. 1993) konnte gezeigt werden, daß diese Zellen der Ursprung phänotypisch unterschiedlicher Derivate sind und daß unterschiedlich differenzierte Zellen von einer multipotenten Vorläuferzelle abstammen. Diese multipotenten Vorläuferzellen besitzen die Fähigkeit zur kontinuierlichen Selbsterneuerung, was sie als Stammzellen definiert (Stemple and Anderson 1992; Morrison et al. 1999). Auch nach der Wanderung besitzen einige Neuralleistenzellen noch das Potential, sich selbst zu erneuern (Bixby et al. 2002; Kruger et al. 2002; Trentin et al. 2004). Phänotypisch sind Neuralleistenstammzellen (NLSZ) durch die gleichzeitige Expression von p75 (niedrig-affiner Nerven Wachstumsfaktor Rezeptor, LNGFR) und SOX10 definiert (Stemple and Anderson 1992; Rao and Anderson 1997; Paratore et al. 2001; Kim et al. 2003). Zellen mit diesen Eigenschaften lassen sich *in vivo* in Muskelzellen, chromaffine Zellen, Neurone, Gliazellen, sowie Melanozyten, Knorpel und Knochen differenzieren (Abb.3) (Anderson et al. 1997; Dorsky et al. 2000; Sieber-Blum 2000; Dupin et al. 2001). Eine Schwierigkeit bei der Untersuchung von Neuralleistenstammzellen

stellt der zeitlich enge Rahmen dar, in dem diese Zellen als Stammzellen existieren: Nach ihrer Wanderung aus dem Neuralrohr an ihre Zielorte, differenzieren sie dort in ihre Derivate (Abb. 3). Sind die Zellen erst terminal differenziert, verlieren sie ihre Fähigkeit, sich selbst zu erneuern und sind auch nicht mehr fähig, in andere Linien zu differenzieren (Weston 1991; Anderson 1993; Lo and Anderson 1995). *In vitro* ist die Situation ähnlich: Die Zellen wandern aus kultivierten Neuralrohren auf zuvor beschichtete Platten aus und beginnen mit der Differenzierung. Bereits nach wenigen Tagen haben sie ihre Multipotenz verloren (Duff et al.1991; Ito und Sieber-Blum 1993; Sieber-Blum et al. 1993). Erschwerend kommt hinzu, daß die Neuralleistenstammzellen nur eine kleine Population innerhalb aller Neuralleistenzellen ausmachen und daß diese Population nur für kurze Zeit existiert (angepasst nach (Maurer 2006)).

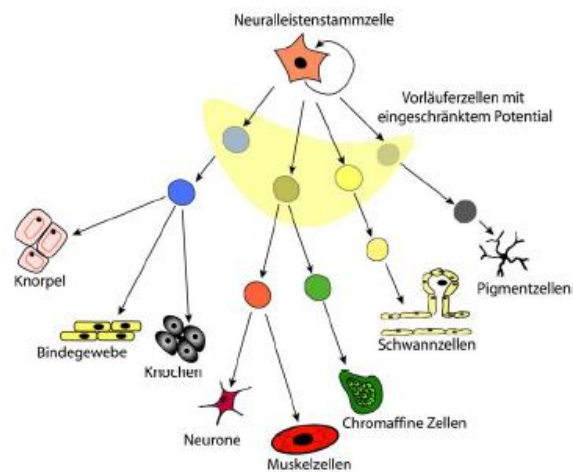


Abb.3: Differenzierungspotential von Neuralleistenstammzellen (NLSZ) in die verschiedenen Derivate der Neuralleiste. NLSZ haben die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und können über Vorläuferzellen mit eingeschränktem Potential zu ihren Derivaten ausdifferenziert werden. Aus NLSZ können Knorpelzellen, Bindegewebe, Knochen, Neurone, Muskelzellen, chromaffine Zellen, Gliazellen und Pigmentzellen differenziert werden (aus (Maurer 2006)).

1.3.1. Immortalisierte Neuralleistenzellen

Um eine Neuralleistenzellstammzelllinie zu etablieren, müssen diese Stammzellen über einen langen Zeitraum bzw. über viele Passagen stabil kultiviert werden können, ohne, daß es zu spontaner Differenzierung kommt. Es darf während dieser Zeit keine Veränderungen der Multipotenz oder der Fähigkeit zur Selbsterneuerung der Zellen geben. Es wurde daher der Versuch unternommen, Neuralleistenzellstammzellen (NLSZ) mit Hilfe eines transformierenden Onkogens zu immortalisieren. Mit dem T-Antigen des Simian Virus 40 (SV40) konnten zwar bereits viele immortalisierte Zelllinien hergestellt werden (Obinata 1997), eine stabile NLSZ Linie konnte mit dieser Methode jedoch bisher nicht generiert werden. Eine weitere Möglichkeit zur Immortalisierung einer NLSZ Linie bietet die stabile Expression des MYCN Onkogens. Hierbei gibt es verschiedene Möglichkeiten: Zum einen kann v-MYC über ein retrovirales System in die Zelle eingebracht werden, zum anderen kann c-MYC in der Zelle unter die Kontrolle eines in NLSZ aktiven Promotors gestellt werden. In ihrer Sequenz unterscheiden sich v-MYC und c-MYC nur durch 1-3 verschiedene Aminosäuren, die transformierende Wirkung hängt hauptsächlich von der Menge des exprimierten MYCN Proteins ab.

1.3.2. Das MONC-1 Modell

1997 versuchte Dr. M. Rao, Neuralleistenzellstammzellen (NLSZ) mit v-MYC zu immortalisieren. Mit Hilfe eines modifizierten Retrovirus sollte v-MYC in die Zelle eingebracht werden (Rao and Anderson 1997). Zuvor konnten nach demselben Prinzip sympathoadrenale Vorläuferzellen (Birren et al. 1991) und Vorläufer der peripheren Gliazellen (Lo et al. 1991) immortalisiert werden. Erste

Versuche mit NLSZ führten zu unterschiedlichen Ergebnissen: Zwar konnte gezeigt werden, daß man NLSZ mit einem Onkogen wie v-MYC immortalisieren kann (Murphy et al. 1991), jedoch waren diese kultivierten NLSZ meist spontaner Differenzierung unterworfen. Es konnte nicht mit Sicherheit gezeigt werden, daß es sich bei der Kultur um eine Stammzellpopulation und nicht um ein Gemisch aus verschiedenen Vorläuferzellen handelte (Murphy al. 1991). Rao bediente sich dennoch des retroviralen Ansatzes und konnte zeigen, daß die von ihm hergestellten MONC-1 Zellen, (engl.: mouse neural crest), die Fähigkeit besaßen, in Neurone, Gliazellen und Melanozyten zu differenzieren. Rao hatte die Zelllinie aus einer einzigen Neuralleistenzelle generiert, diese hatte das für NLSZ typische Markerprotein p75 exprimiert. Hierdurch war sichergestellt, daß sich die Linie nicht aus verschiedenen Subpopulationen zusammensetzte. MONC-1 Zellen konnten bei konstitutiv aktivem v-MYC differenzieren. Jedoch exprimierten spätere Passagen der Zellen weniger p75. Auch nahm in höheren Passagen die Tendenz, Neurone auszubilden ab (Rao and Anderson 1997). Desweiteren verlängerten sich mit ansteigendem Alter der verwendeten Zellen die benötigten Zeiträume für die Differenzierung. Somit schien es zwar sicher gelungen, eine Neuralleistenstammzelllinie zu generieren, allerdings bleibt unklar, ob die MONC-1 Zellen nicht im Laufe der Zeit ihre Multipotenz verlieren und ob nicht ein aktives v-MYC in der Zelle Differenzierungsvorgänge beeinflußt und somit Untersuchungsergebnisse zu diesen Vorgängen verfälschen kann. Nichtsdestotrotz wurde die MONC-1 Zelllinie in einigen Studien erfolgreich verwendet (Sommer et al. 1995; Jain et al. 1998; Chen and Lechleider 2004).

1.3.3. Das JoMa1 Modell

Ein Nachteil von v-MYC ist seine dauerhafte Aktivität, hierdurch ist eine Untersuchung der transfizierten Zellen ohne v-MYC-Einfluß nicht möglich. Als Variante, um sich die proliferativen Eigenschaften von MYCN zunutze zu machen und untersuchen zu können, bietet sich das c-MycER^T-Konstrukt von Dr. T. D. Littlewood an: Dieses Konstrukt kodiert das Fusionsprotein c-MycER^T, bestehend aus den Aminosäuren 1-435 des humanen c-MYC, an das sich eine mutierte Hormon-Binde-Domäne des murinen Östrogenrezeptors (Aminosäuren 281-599, mit Mutation eines Glyzins zu einem Arginin an Position 525) anschließt. Aufgrund der Mutation wird das translatierte Protein an Position 525 nicht durch endogenes Östrogen, sondern nur durch das im Körper nicht produzierte 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) aktiviert (Littlewood et al. 1995). Unter Verwendung des c-MycER^T-Konstrukts, wurde eine genetisch veränderte Mauslinie, die ROSA Δ neo-Linie, etabliert. Tiere der ROSA Δ neo-Mauslinie tragen im ROSA26-Lokus, dessen Promotor während der Embryonalentwicklung ubiquitär aktiv ist (Zambrowicz et al. 1997), eine Kopie der DNA-Sequenz, die das c-MycER^T kodiert. Diese DNA-Sequenz wurde über homologe Rekombination eingebracht (Jäger, Maurer et al. 2004). In weiteren Schritten wurden Neuralleistenkulturen angelegt, die Kultivierung erfolgte in speziellem Neuralleistenstammzellmedium unter Zusatz von 4-OHT, wodurch das c-MycER^T-Fusionsgen aktiviert wurde. Durch die kontinuierliche c-MYC Expression wurden die Zellen in einem dedifferenzierten Zustand gehalten. Es konnten Langzeit-Kulturen von NLSZ angelegt werden. Diese wurden JoMa1 genannt. JoMa1 weisen typische Marker von NLSZ auf (Abb.4) und lassen sich *in vitro* nach 4-OHT-Entzug und Kultivierung in entsprechenden Differenzierungsmedien

(Abb.5: BMP2 induzierte Neurogenese) in alle Derivate der Neuralleiste differenzieren (Maurer et al. 2007).

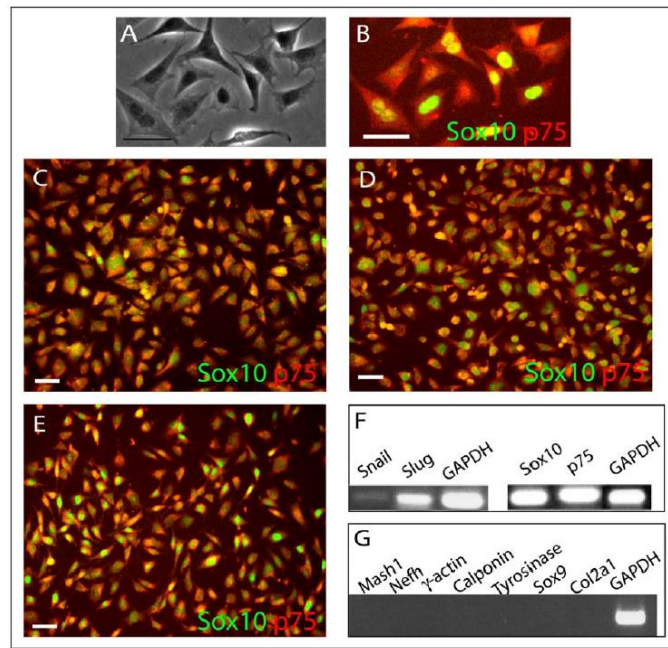


Abb.4: JoMa1 Zellen weisen die typischen Neuralleistenstammzellmarker p75, Sox10, Snail und Slug auf. (A) Mikroskopische Aufnahme von JoMa1 Zellen (Passage12) unter Tamoxifen-Einfluß im Phasenkontrast. (B) JoMa1 Zellen (Passage12) nach Markierung mit Sox10 (FITC) und p75 (Cy3). (C) JoMa1 Zellen (Passage13) nach Markierung mit Sox10 (FITC) und p75 (Cy3). (D) JoMa1 Zellen (Passage19) nach Markierung mit Sox10 (FITC) und p75 (Cy3). (E) JoMa1 Zellen (Passage31) nach Markierung mit Sox10 (FITC) und p75 (Cy3). (F) RT-PCR zum Nachweis von Snail, Slug, Sox10, p75 und GAPDH aus der RNA von undifferenzierten JoMa1-Zellen (Passage20). Marker sind in der Abbildung den Banden zugeordnet. (G) Kontroll-RT-PCR mit JoMa1-RNA (Passage20) mit allen für die Differenzierungen verwendeten Markern. RNA aus Zellen unter Tamoxifen-Gabe (Passage20). Verwendete Marker sind im Bild den Banden zugeordnet (aus (Maurer et al. 2007)).

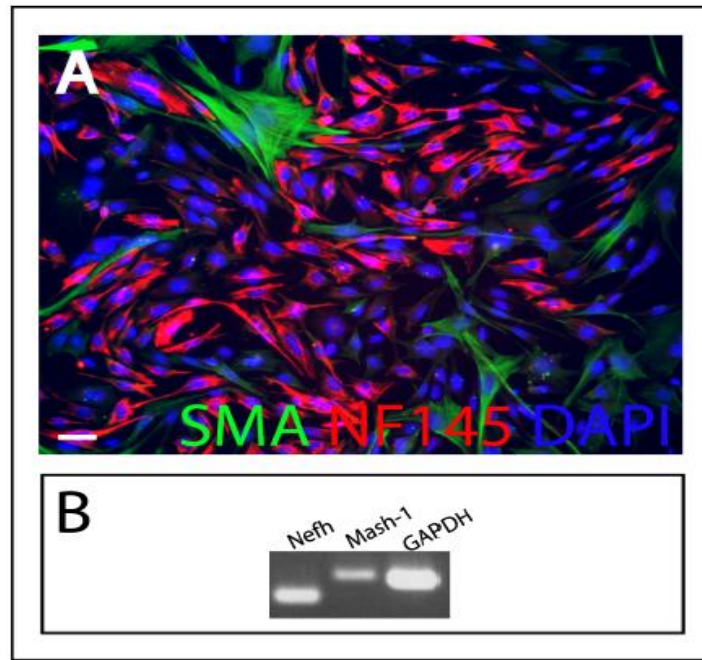


Abb.5: BMP2 induzierte die Neurogenese in JoMa1 Zellen. (A) JoMa1 Zellen für sechs Tage unter neuronalen Differenzierungsbedingungen. Die Zellen wurden markiert mit SMA und NF145, DAPI diente zur Visualisierung der Zellkerne. Die Farben der Antikörper sind im Bild indiziert. Der Größenstandard zeigt 40 μm. (B) RT-PCR-Analyse von RNA-Extrakten der differenzierten JoMa1 Zellen. Es konnten Fragmente für Nefh und Mash-1 detektiert werden. GAPDH diente als Kontrolle (aus (Maurer et al. 2007)).

1.4. Ziele der aktuellen Studie

In dieser Studie sollte die Frage beantwortet werden, ob Neuroblastome aus Neuralleistenprogenitorzellen entstehen können. Die Beantwortung dieser Frage ist wichtig für das Verständnis der Neuroblastompathogenese.

Die experimentelle Strategie dieser Studie umfaßt die Etablierung und Charakterisierung eines Modells der Neuroblastompathogenese, basierend auf der Neuralleistenstammzelllinie JoMa1.

Dazu müssen die folgenden Einzelfragen beantwortet werden:

1. Lassen sich JoMa1 Neuralleistenstammzellen stabil transfizieren?
2. Führen MYCN und ALK^{F1174L} zu einer Immortalisierung von JoMa1 Neuralleistenstammzellen *in vitro*?
3. Sind mit MYCN und mit ALK^{F1174L} transfizierte JoMa1 Neuralleistenstammzellen tumorigen *in vivo*?
4. Ähneln die induzierten Tumoren in ihrer Histopathologie menschlichen Neuroblastomen?
5. Lassen sich aus den experimentellen Tumoren murine Neuroblastomzelllinien isolieren?

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Verwendete Zellkulturlösungen, Zusätze und Antibiotika

Amphotericin B / Gibco® Invitrogen (Carlsbad, CA)

b-FGF / Upstate Biotechnology (Charlottesville, VA)

B-27 Supplement / Gibco® Invitrogen (Carlsbad, CA)

DMEM / Gibco® Invitrogen (Carlsbad, CA)

EGF / Upstate Biotechnology (Charlottesville, VA)

FCS / Biochrom KG (Berlin)

Fibronectin / BD Bioscience (Charlottesville, VA)

HAM's F12 / Gibco® Invitrogen (Carlsbad, CA)

Hühnerembryonenextrakt / Eigenherstellung

N-2 Supplement / Gibco® Invitrogen (Carlsbad, CA)

Penicillin/Streptomycin / Invitrogen (Carlsbad, CA)

Poly-D-Lysin / Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)

RPMI / Gibco® Invitrogen (Carlsbad, CA)

Trypsin/EDTA / PAA (Linz)

2.1.2. Verwendete Chemikalien

Agarose / Life Technologies (Gaithersburg)

Beta-Mercaptoethanol / Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)

BSA / Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)

Chloroform / Merck (Darmstadt)

DMSO / Merck (Darmstadt)

DTT / Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)

Ethanol / J. T. Baker (Deventer)

Ethidium Bromid / Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)

Farbstoff Hoechst 33258 / Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)

Glycerol / Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)

Isopropanol / Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)

Längenmarker 100bp / Fermentas (Vilnius)

Längenmarker 1kb / Fermentas (Vilnius)

Matrigel / Gibco® Invitrogen (Carlsbad, CA)

Methanol / J. T. Baker (Deventer)

MTT / Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)

Natriumacetat 3M / Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)

Natronlauge NaOH 1M / Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)

Paraformaldehyd / Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)

SDS 4x / GERBU (Gaiberg)

Trizol Reagent / Invitrogen (Carlsbad, CA)

2.1.3. Verwendete Enzyme

DNase I / Qiagen (Hilden)

Taq-Polymerase / Roche (Mannheim)

Universal PCR Mastermix / Applied Biosystems (Darmstadt)

Restriktionsenzyme / New England Biolabs (Ipswich, MA)

Reverse Transkriptase SS2 / Invitrogen (Carlsbad, CA)

Proteinkinase K / New England Biolabs (Ipswich, MA)

Hyaluronidase TypIV-S / Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)

2.1.4. Verwendete Verbrauchsmaterialien

Combitips 2,5; 5 ml / Eppendorf (Hamburg)

Falcon® Gewebekulturflaschen 75 cm² / Greiner bio-one (Frickenhausen)

Gewebekulturflaschen 25 cm² / Costar® Milian (Genf)

Gewebekulturplatte 6; 12; 24; 96 wells / Corning (Kaiserslautern)

Injekt-F 1® ml Einmalspritzen / B. Braun Biotech International (Melsungen)

Kanülen 0,4 mm Durchmesser / B. Braun Biotech International (Melsungen)

Lab-Tek® Chamber Slide® / Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA)

Milipore Stericup 0,25; 0,48 µm / Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA)

Pasteurpipetten / Brand (Wertheim)

Pipette 2; 5; 10; 25 ml steril / Greiner bio-one (Frickenhausen)

Pipettenspitzen / Starlab (Ahrensburg)

PMMA-Einmalküvetten / Roth (Karlsruhe)

PP-Röhrchen 15; 50 ml / Greiner bio-one (Frickenhausen)

Safe lock tubes 0,2; 1,5; 2,0 ml / Eppendorf (Hamburg)

Serologische Einwegpipetten 2; 5; 10; 25 ml / Greiner bio-one (Frickenhausen)

Zellkulturschalen 10; 14,5 cm Durchmesser / Greiner bio-one (Frickenhausen)

Zellschaber 28 cm / Greiner bio-one (Frickenhausen)

Zentrifugenröhrchen / Beckman Coulter (Krefeld)

2.1.5. Verwendete Lösungen und Puffer (sofern nicht in Kits enthalten)

Ladepuffer

50% Glycerin; EDTA pH8,0 1mM; 0,25% Bromphenolblau; 0,25% Xylencyanol FF

TAE Puffer (50x)

Tris 2M; EDTA pH 8,0 50mM

PBS

NaCl 140mM; KCl 10mM; Na₂HPO₄ 6,4mM; KH₂PO₄ 2mM

MTT-Solubilisierungslösung

DMSO 100 ml; SDS 10%; Eisessig 0,6 ml

2.1.6. Verwendete Kits

RNeasy® Mini Kit / Qiagen (Hilden)

DNeasy® Blood & Tissue Kit / Qiagen (Hilden)

HiSpeed® Plasmid Maxi-, bzw. Mini-Kit / Qiagen (Hilden)

Gateway® LR Clonase II Enzyme Mix / Invitrogen (Carlsbad, CA)

NucleoSpin® Extract II / Macherey-Nagel (Düren)

2.1.7. Verwendete Geräte

Biodoc Analyzer / Biometra (Göttingen)

Certomat H / B. Braun Biotech International (Melsungen)

Citadel 1000 / Thermo Shandon (Frankfurt a.M.)

CO₂ Inkubator Steri-Cult 200 / Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA)

Einbettstation Oxford Trade / SLEE (Mainz)

Elektrophoresekammern / Invitrogen (Carlsbad, CA)

EL-800 Microplate Reader / Bio-Tek Instruments (Bad Friedrichshall)

Fluoreszenzmikroskop IM 35 / Zeiss (Oberkochen)

Kamera Fluoreszenzmikroskop / Pentax (Tokio)

Laborwaage EW420-3NM / Kern & Sohn (Balingen-Frommern)

Meßtaster electronic digital caliper

Motic AE31 Inversmikroskop mit moticam 1000/ Motic (Wetzlar)

Microporator MP-100 / Digital Bio (Korea)

Mikrotom 2040 Reichert-Jung / Leica-Microsystems AG (Wetzlar)

NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer / PeqLab (Erlangen)

Pipetus / Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt)

Rotor Ti-45 / Beckman Coulter (Krefeld)

StepOne Plus Real-time-PCR / Applied Biosystems (Darmstadt)

Sterilbank HERA-Safe HS12 / Heraeus (Hanau)

Thermal Cycler C1000 / Bio-Rad (München)

Thermomixer comfort / Eppendorf (Hamburg)

T personal / Biometra (Göttingen)

T gradient / Biometra (Göttingen)

Ultrazentrifuge Optima L5-50 / Beckman Coulter (Krefeld)

UVichemi / Biometra (Göttingen)

xCELLigence RTCA / Roche/ACEA Biosciences, Inc. (San Diego, CA)

Zentrifuge Allegra X-22R / Beckman Coulter (Krefeld)

Zentrifuge Mikro 22R / Hettich (Tuttlingen)

Zentrifuge 5415D / Eppendorf (Hamburg)

Z1 Coulter Partikel Counter / Beckman Coulter (Krefeld)

2.1.8. Verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotide zur Amplifizierung und für analytische und präparative Agarose-Gele

ALK-[F1174L] sense (822 bp) / gtacaagctgagcaagcttcgcacctcgac

ALK-[F1174L] reverse (822 bp) / ggtgggtccatgcggccgccactggtgac

Gapdh sense (300 bp) / gtgaaggctcgggtgtaacg

Gapdh reverse (300 bp) / ggtgaagacaccagtagactc

MYCN sense (250 bp) / ctgctcc acgt ccacat

MYCN reverse (250 bp) / ctcgttctcaagcagcatctc

pgk1 sense (172 bp) / cagcccaagcttaccatgac

pgk1 reverse (172 bp) / agagttcttcagctcgggtg

Oligonukleotide zur Sequenzierung der Multiple cloning site (MCS) in pMSCVpuro

pMSCVpuro sense / cccttgaacctcctcgttcga

pMSCVpuro reverse / gagacgtgctacttccatttg

2.1.9. Verwendete Hühnereier

Zur Herstellung des Hühnerembryonenextrakts kamen erregerefreie bebrütete Hühnereier der Sörries-Trockels Vermehrungszucht GmbH & Co.KG, (Möhnesee-Hewingsen) zum Einsatz.

2.1.10. Verwendete Zelllinien

JoMa1 Neuralleistenstammzellen wurden freundlicherweise von Jochen Maurer, Sanford-Burnham Medical Research Institute, San Diego, USA, zur Verfügung gestellt.

2.1.11. Verwendete Versuchstiere / Mauslinien

Es kamen athyme, somit immundefiziente, Nacktmäuse der NMRI Mauslinien zum Einsatz.

2.1.12. Verwendete Software

GraphPad Prism5

RTCA Software 1.2 / xCELLigence System Roche (Rotkreuz)

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

Zelllinien

Verwendete Zelllinien waren die murine Neuralleistenstammzelllinie JoMa1 (Maurer et al. 2007), sowie deren Derivate JoMa1-MYCN, JoMa1-ALK^{F1174L} und JoMa1-EGFP, die im Rahmen dieser Arbeit etabliert wurden. Außerdem wurden die aus experimentell induzierten Tumoren isolierten murinen Neuroblastomzelllinien JoMa1-MYCN-T1 bis JoMa1-MYCN-T6, sowie JoMa1-ALK^{F1174L}-T1 und JoMa1-ALK^{F1174L}-T2 kultiviert.

Kultur

Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen (Laminar-flow) durchgeführt. Sämtliche Zellen wurden bei 37 °C, einer Luftfeuchtigkeit von 80% und einem CO₂-Partialdruck von 5% inkubiert. Zu allen Medien wurden 100 units/ml Penicillin-Streptomycin zugegeben. Die selbst etablierten murinen Neuroblastom-Zelllinien (NB-Zelllinien) wurden in Standardmedium für NB-Zelllinien, versetzt mit 10% FCS (fetal calf serum), kultiviert, ein Mediumwechsel fand alle 2 bis 3 Tage, bzw. in Abhängigkeit der Farbe des Mediums statt.

Mykoplasmentest

In regelmäßigen Abständen wurden die Zellkulturen auf eine eventuelle

Kontamination mit Mykoplasmen hin untersucht. Hierzu wurden die Zellen in Medium ohne Zusatz jeglichen Antibiotikums kultiviert und anschließend mit dem DNA-spezifischen Farbstoff Hoechst 33258 gefärbt. Im Fluoreszenzmikroskop können so evtl. vorhandene Mykoplasmen erkannt werden (Lindl 2000).

Passage von Zelllinien

Die Tumorzelllinien wurden bei Erreichen einer ca. 80%igen Konfluenz passagiert, bzw. gesplittet. Dazu wurde das Medium abgesaugt und 3-5 ml (T75 Flasche), bzw. 1-2 ml (T25 Flasche) 0,2% Trypsin/EDTA auf die Zellen gegeben. Nach 3minütiger Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen im Mikroskop kontrolliert und das Trypsin mittels Medium inaktiviert. Danach wurden die Zellen 5 min bei 1500 x g pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 2 ml frischem Medium resuspendiert und die gewünschte Anzahl Zellen erneut ausplattiert. Die JoMa1 Zellen und die Derivate JoMa1-MYCN, JoMa1-ALK^{F1174L} und JoMa1-EGFP wurden bereits bei Erreichen einer ca. 70%igen Konfluenz gesplittet. Um die Einwirkung zu großer g-Kräfte auf die Zellen zu verhindern, wurden die Zellen nach Abtrypsinierung nur für 3 min und nur mit 800 x g zentrifugiert, auch waren die Bremsen der Zentrifuge ausgeschaltet.

Kryokonservierung

Alle Zellen wurden wie unter ‚Passage‘ beschrieben abtrypsiniert, pelletiert und dann in FCS mit 10% DMSO Zusatz aufgenommen. Anschließend wurden sie langsam in einer Styroporbox bei -80°C eingefroren und nach zwei Tagen in

flüssigen Stickstoff (-174 °C) überführt.

Deckgläser-Kultur

Für verschiedene Untersuchungen erfolgte die Kultur von Zellen auf speziellen Deckgläsern, es wurden LabTek® Chamber Slides® verwendet. Diese wurden unter sterilen Bedingungen (Laminar-flow) ausgepackt und die entsprechenden Zellen auf ihnen ausplattiert und unter oben genannten Bedingungen inkubiert.

2.2.1.1. Herstellung von Hühnerembryonenextrakt (HEE)

Zur Herstellung des HEE wurde ein Protokoll von Mahendra Ray in leicht modifizierter Form verwendet (Rao et al. 1997 (vergleiche Maurer 2007)). Es wurden für 11 Tage bei 37 °C in einem luftbefeuchteten Inkubator bebrütete Hühnereier bestellt. Die Eier wurden mit 70%igem Ethanol gewaschen, dann in eine saubere Schale geschlagen, die Embryonen mit einer feinen Pinzette sauber vom Dottersack getrennt und in 4 °C kaltem DMEMGlutamax® gesammelt. Zur Mazeration wurden die Embryonen durch eine 60 ml Spritze gedrückt (11 Embryonen / Spritze). Das Lysat wurde in 50 ml Röhrchen aufgenommen und 1:1 mit DMEMGlutamax® gemischt. Das Gemisch wurde für 45 min bei 4 °C geschüttelt. Es wurde sterile Hyaluronidase (1 mg / 25 g Embryo) hinzugegeben, bevor der Ansatz mit 180.000 x g x h im Vakuum zentrifugiert wurde [es wurde 6 h mit 30000 x g in einem Ti-45 Rotor mit einer Optima L5-50 Zentrifuge (Beckman Coulter) zentrifugiert]. Anschließend wurde der Überstand unter sterilen Bedingungen filtriert, zunächst mittels Filter einer Porengröße von 0,45 µm, im zweiten Durchgang mittels 0,22 µm-Filter, und in 5 ml Aliquots bei -80 °C gelagert. Der komplette Vorgang der Herstellung des

HEE vom bebrüteten Hühnerei bis hin zum fertig gefilterten Extrakt wurde erstmalig in Form eines Video Artikels im Journal of Visualized Experiments veröffentlicht (Bohrer und Pajtler 2010).

2.2.1.2. Herstellung von Neuralleistenstammzell-Medium

Zur Kultivierung der JoMa1 wurde sog. Neuralleistenstammzell-Medium (NLSZ-Medium), ein modifiziertes Standardmedium, erstmalig beschrieben von Stemple und Anderson (Stemple und Anderson 1992), verwendet. Zu einer Mischung aus DMEMGlutamax® und Ham's F12® im Verhältnis 1:1 wurden zugegeben: 1% N2-Supplement, 2% B27-Supplement, 10 ng/ml EGF, 1 ng/ml FGF, 100 units/ml Penicillin-Streptomycin und 10% Hühnerembryonenextrakt (HEE).

2.2.1.3. Kultur von JoMa1 Neuralleistenstammzellen und deren Derivaten

JoMa1 Neuralleistenstammzellen (NLSZ) benötigen zur Kultur zum einen ein spezielles Neuralleistenstammzellmedium (NLSZ-Medium), das mit 10% Hühnerembryonenextrakt (HEE) versetzt wird. Der HEE wurde wie unter 2.2.1.1. beschrieben eigens hergestellt. Zum anderen müssen die Kulturschalen, bzw. Kulturflaschen, vor Aussaat der JoMa1 NLSZ jeweils mit frischem Fibronektin benetzt werden, dieses muß über einige Stunden trocknen vor Hinzugabe des NLSZ-Mediums. Zur Kultur der mit MYCN, EGFP und ALK^{F1174L} transfizierten Derivate von JoMa1 wurde außerdem das Selektionsantibiotikum Puromycin in einer Endkonzentration von 1µg/ml zugesetzt. Die Kultivierung von JoMa1 erfordert einen täglichen Medienwechsel, da den Zellen täglich frisches 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) zugeführt werden muß, damit das c-Myc^{ERT}

Fusionsgen aktiviert wird und die Zellen durch kontinuierliche c-MYC Expression in einem dedifferenzierten Zustand gehalten werden können. Auch das Medium der mit EGFP transfizierten JoMa1 wurde mit 4-OHT versetzt und täglich ausgewechselt. Hingegen wurde dem Medium von JoMa1-MYCN, bzw. JoMa1-ALK^{F1174L} kein 4-OHT zugefügt, da MYCN, bzw. ALK^{F1174L} die Zellen immortalisiert hat und diese nicht mehr auf eine kontinuierliche c-MYC Expression angewiesen waren. In den ersten Tagen nach Transfektion wurde das Medium der JoMa1-MYCN und JoMa1-ALK^{F1174L} dennoch täglich gewechselt, damit das Selektionsantibiotikum Puromycin wirken konnte. Nach Nachweis der stabilen Integration des Vektors pMSCvpuro-MYCN, bzw. pMSCvpuro-ALK^{F1174L}, mittels PCR wurde alle 2 bis 3 Tage ein Mediumwechsel vorgenommen. JoMa1 Zellen und ihre Derivate JoMa1-MYCN, JoMa1-ALK^{F1174L} und JoMa1-EGFP wurden bereits bei Erreichen einer ca. 70%igen Konfluenz gesplittet. Um die Einwirkung zu großer g-Kräfte auf die Zellen zu verhindern, wurden diese nach Abtrypsinierung nur für 3 min und nur mit 800 x g zentrifugiert, auch waren die Bremsen der Zentrifuge ausgeschaltet. JoMa1 und ihre Derivate wurden wie unter 2.2.1. ‚Kryokonservierung‘ beschrieben konserviert.

2.2.1.4. Isolierung und Kultivierung von murinen Neuroblastomzelllinien

Um aus dem Tumor einer Maus eine Zelllinie zu etablieren, wurde die jeweilige Maus durch Genickbruch getötet und mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Unter sterilen Bedingungen wurde der Tumor entfernt und in physiologischer Kochsalzlösung gespült. Nach Zerteilung des Tumors mit einem Skalpell in etwa 1 mm große Stücke, wurden diese in 0,1% Trypsin/EDTA für 30 min bei

Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach Inkubation wurde ein Trypsininhibitor zugegeben und die Stücke wurden durch auf- und abpipetieren weiter zerkleinert. Nach absetzen der größeren Teile wurde der trübe Überstand abpipetiert und bei 400 rpm für 5 min zentrifugiert. Das so erhaltene Pellet bildete die erste Fraktion. Die größeren noch verbliebenen Tumorstücke wurden mit CMF PBS aufgefüllt und weiter mit der Pipette zerkleinert. Nach absetzen der größeren Bestandteile wurde der Überstand abgenommen und bei 400 rpm für 5 min zentrifugiert. Das so erhaltene Pellet bildete die zweite Fraktion. Die einzelnen Fraktionen wurden auf Platten beschichtet mit Poly-D-Lysine, bzw. Fibronectin und Matrigel auf je 4 Löcher einer 24 Lochplatte zu gleichen Teilen verteilt, zunächst in einem geringen Volumen serumfreien Mediums. Die einzelnen Wells wurden daraufhin mit je 1 ml des folgenden Mediums aufgefüllt und bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert: DMEM, Glutamax und 10% FCS Biochrom 0307H, welches speziell für Primärkulturen geeignet ist. Mit den noch verbliebenen Tumorstücken wurde gleichermaßen verfahren. Nach 24h fand ein Mediumwechsel statt und die Kulturen wurden bezüglich ihrer Adhärenz, der Zellzahl und der Anzahl toter Zellen beurteilt. Wenn die Zellen auf unbeschichteten Platten wuchsen, wurden verschiedene Passagen der Zelllinie eingefroren und bei -80 °C gelagert. Die Zelllinien wurden JoMa1-MYCN-T1 bis JoMa1-MYCN-T6, bzw. JoMa1-ALK^{F1174L}-T1 und JoMa1-ALK^{F1174L}-T2 genannt (vergleiche Tab.5).

2.2.2. MTT Proliferationsassay

Der MTT Proliferationsassay dient der Quantifizierung und Viabilitätsmessung von Zellen unter Einfluß verschiedener Faktoren (in dieser Studie u. a

Selektionsantibiotika, Inhibitoren und Bestandteile der Kulturmedien). Der MTT Assay beruht auf der mitochondrialen Reduktion von 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu einem lila Formazan Salz (Mosmann 1983). Diese Farbänderung kann mittels Photometer quantifiziert werden. Der MTT Assay kann in 96 Loch Mikrotiterplatten durchgeführt werden. Zur Durchführung wurden die entsprechenden Zellen in 96 Loch Mikrotiterplatten kultiviert und dem Versuch entsprechend mit exogenen Faktoren behandelt. Danach wurde pro Loch 20 µl MTT Lösung hinzupipettiert (6 mg / ml MTT in PBS) und die Zellen für 4 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde das Medium abgesaugt, 100 µl Solubilisierungslösung (10% SDS, 0,6 ml Eisessig / 100 ml, in DMSO) hinzugegeben und für 1 h bei 37°C und gelegentlichem Schütteln inkubiert. Danach wurde der farbige MTT Umsatz im EL-800 Microplate Reader® (Bio-Tek Instruments) bei 570 nm gemessen und ausgewertet.

2.2.3. DNA-Isolation

Eine Möglichkeit, DNA ohne Phenol- oder Chloroform-Extraktion zu gewinnen, bietet das DNeasy® Blood & Tissue Kit von Qiagen. Das Puffersystem dieses Kits erlaubt die direkte Lyse der Zellen mit Hilfe von Proteinkinase K, gefolgt von selektiver Bindung der DNA an eine DNeasy® Membran während der Zentrifugationsschritte. Verbliebene Kontaminationen und Enzyminhibitoren werden von der DNeasy® Membran nicht gebunden und können mit dem Durchfluss verworfen werden. Alle Zentrifugationsschritte wurden mit einer Mikrozentrifuge bei RT durchgeführt.

Aus Zellen: Zur Lyse wurden 5×10^6 Zellen für 5 min bei 300 x g zentrifugiert, das Pellet wurde in 200 µl PBS resuspendiert und 20 µl Proteinase K

hinzugeben. Hiernach wurden 200 µl AL Puffer (im Kit enthalten, enthält Guanidin Hydrochlorid) dazugeben, sofort für ca. 10 sec gevortext bis eine homogene Lösung entstand, die für 10 min bei 56°C inkubiert wurde. Im nächsten Schritt wurden 200 µl Ethanol 100%ig dazugeben und für ca. 10 sec gevortext, bis eine homogene Lösung entstand. Diese wurde in eine DNeasy® Mini Spin Säule (im Kit enthalten) gegeben, die sich in einem 2 ml Sammeltube befand. Es wurde für 1 min bei 6000 x g zentrifugiert, Durchfluß und Tube wurden verworfen. Die Säule wurde in einem neuem 2 ml Sammeltube platziert und 500 µl AW1 Puffer (im Kit enthalten, enthält Guanidin Hydrochlorid) hinzugeben. Es wurde für 1 min bei 6000 x g zentrifugiert, Durchfluß und Tube wurden verworfen. Die Säule wurde wieder in einem neuem 2 ml Sammeltube platziert und es wurden 500 µl AW2 Puffer (im Kit enthalten) hinzu gegeben. Es wurde für 3 min bei 20000 x g zentrifugiert. Dieser Schritt dient dazu, die Membran in der Säule zu trocknen. Durchfluß und Tube wurden verworfen. Ein gründliches Trocknen der Membran ist sehr wichtig, da ansonsten eventuell zurückgebliebener Ethanol auf spätere Reaktionsschritte Einfluß nehmen könnte. Die Säule wurde vorsichtig aus dem Sammeltube genommen, ohne mit dem ethanolhaltigen Durchfluß in Berührung zu kommen. Daraufhin wurde sie in einem neuem 2 ml Sammeltube platziert und es wurden 200 µl AE Puffer (im Kit enthalten), bzw. Aqua destillata direkt auf die Membran gegeben. Es wurde für 1 min bei RT inkubiert, dann für 1 min bei 6000 x g zentrifugiert. Dieser Schritt diente dazu, die DNA aus der Membran zu lösen (Elution). Für eine besonders hohe Ausbeute an DNA bietet es sich an, den letzten Schritt zu wiederholen. Die Konzentration der DNA wurde am NanoDrop Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen, da in diesem

Wellenlängenbereich die aromatischen Ringe der Basen der DNA absorbieren. Eine OD_{260} von 1 entspricht einer DNA-Konzentration von 33 $\mu\text{g/ml}$. Um die Reinheit der DNA zu bestimmen, wurde gleichzeitig eine photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration bei 280 nm durchgeführt. In diesem Bereich absorbieren die aromatischen Aminosäuren der Proteine. Reine DNA besitzt einen OD_{260}/OD_{280} -Wert von 1,8. Eine mit Proteinen verunreinigte DNA-Lösung hat einen geringeren Wert.

Aus Tiergewebe: Nur die ersten Schritte unterschieden sich vom Protokoll für die DNA Isolation aus Zellen: Bis zu 25 mg des Tumorgewebes wurden in kleine Stücke geschnitten und in ein 1,5 ml Sammeltube gegeben, 180 μl ATL Puffer (im Kit enthalten) wurden hinzugegeben. Zur Lyse des Gewebes wurden 20 μl Proteinase K hinzu gegeben, ca. 15 sec gevortext und bei 56°C in einem Thermomixer inkubiert, bis sich das Gewebe komplett aufgelöst hatte. Hiernach wurde erneut für ca. 15 sec gevortext, dann wurden 200 μl AL Puffer (im Kit enthalten) hinzu gegeben und erneut gut gemischt durch vortexen. Nun wurden 200 μl Ethanol 100%ig hinzugegeben und sofort erneut durch ausgiebiges vortexen gut mit dem restlichen Inhalt vermischt. Die letzten Schritte waren die gleichen, wie oben aufgeführt.

2.2.4. RNA-Isolation

Zur Genexpressionsanalyse mittels semiquantitativer RT-PCR und quantitativer Echtzeit-PCR wurde RNA unter strenger Vermeidung der Kontamination mit DNA aus Zellen und Gewebe extrahiert. Das Protokoll des RNeasy® Mini Kit (Qiagen) ist eine Erweiterung der Guanidiniumthiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion nach Chomczynski und Sacchi (Chomczynski und Sacchi 1987) und

beinhaltet folgende Schritte: Lyse und Homogenisierung durch RLT Puffer, Präzipitation der RNA durch Ethanol, Bindung der RNA an eine Silica-Membran, 3faches waschen und lösen der RNA aus der Membran. Genomische DNA wurde durch die Silica-Membran in einer gDNA Eliminator® Spin Säule entfernt, es war kein Verdau mit DNase nötig. Alle Zentrifugationsschritte fanden bei Raumtemperatur mit einer Mikrozentrifuge statt. Zur Lyse und Homogenisierung wurden bis zu 1×10^7 Zellen nach Entfernung des Mediums und einem Waschgang mit PBS abtrypsiniert und für 5 min bei $300 \times g$ zentrifugiert. Das Pellet wurde in 600 µl RLT Puffer resuspendiert. RLT Puffer ist im Kit enthalten und beinhaltet Guanidinthiocyanat, dieses denaturiert Proteine und stabilisiert somit die RNA. Die Mischung wurde gevortext bis sich ein homogenes Lysat bildete. Hierbei war darauf zu achten, dass der RLT Puffer zuvor mit frischem β -Mercaptoethanol versetzt wird. Das Lysat wurde direkt auf eine QIAshredder® Spin Säule in einem 2 ml Sammel tube geladen und für 2 min bei $30000 \times g$ zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurde das 1fache Volumen an 70%em Ethanol zum homogenisierten Lysat hinzugefügt; meist handelte es sich hierbei um weniger als 600 µl, da während der Homogenisierung Volumen verloren ging. Bis zu 700 µl der Probe wurden auf eine RNeasy® Spin Säule (im Kit enthalten) in einem 2 ml Sammel tube aufgetragen und für 15 sec bei $8000 \times g$ zentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen. Nun wurden 700 µl RW1 Puffer (im Kit enthalten, enthält Ethanol) auf die Säule gegeben, der Deckel des Sammel tubes erneut sachte verschlossen und für 15 sec bei $8000 \times g$ zentrifugiert. Die Säule wurde ohne Berührung des Durchflusses aus dem Sammel tube entnommen. Im nächsten Schritt wurden 500 µl RPE Puffer (im Kit enthalten) auf die Säule gegeben und für 2 min bei $8000 \times g$ zentrifugiert.

Dieser Schritt diente dem Waschen der Membran in der Säule, Ethanolreste wurden so mit dem Durchfluß im Sammel tube verworfen. Zur Sicherheit wurde in einem neuen 2 ml Sammel tube ein weiteres Mal für 1 min bei 30000 x g zentrifugiert und auch dieses Tube mitsamt Durchfluß verworfen. Für den letzten Schritt wurde die Säule in einem neuen 1,5 ml Sammel tube platziert und 50 µl RNase-freies Aqua dest. hinzugegeben und für 1 min bei 8000 x g zentrifugiert, um die RNA aus der Membran zu lösen. Die Konzentration der RNA wurde am NanoDrop Spektrophotometer photometrisch gemessen.

2.2.5. Synthese von cDNA aus isolierter RNA mittels reverser Transkription

Bei der reversen Transkription (RT) wird mRNA unter Verwendung des Enzyms ‚Reverse Transkriptase‘ in cDNA umgeschrieben. Ausgehend von der cDNA können weitere Analysen wie semiquantitative oder quantitative PCR durchgeführt werden. Zur RT wurden zufällig gestaltete Oligonukleotide (Primer) verwendet, die im Gegensatz zu Oligo-Deoxy-Thymin-Nukleotiden auch an RNA binden, die keine Poly-Adenin-Sequenz trägt. Die hier verwendete Reverse Transkriptase stammt aus dem Maus-Leukämie-Virus und trägt eine Mutation, die die Aktivität der RNase H unterbindet (Kotewicz et al 1985 und 1988). So wird verhindert, dass RNA abgebaut wird, bevor sie komplett transkribiert werden konnte. Nach der Synthese der cDNA wird die RNA durch Zugabe von RNase H abgebaut. Pro Probenansatz wurde nach folgendem Schema vorgegangen: 3 µg RNA (in 6 µl gelöst), 1 µl dNTPs (20mM, 5µM je Nukleotid) und 3 µl ‚Random‘ Primer (3 µg / µl) wurden für 5 min bei 65°C denaturiert. Nach einer 1minütigen Pause bei 1°C wurden ein RT-Reaktionsgemisch bestehend aus 5 µl First Strand RT-Puffer (5x), 5 µl MgCl₂ (25mM), 1,25 RNase

Inhibitor RNaseOUT (40 units/ μ l), sowie 1,25 μ l Superscript II Reverse Transkriptase (200 units/ μ l) zugegeben und folgende Inkubationsschritte durchgeführt: 10 min bei 25 °C (Annealing), 50 min bei 42 °C (Synthese) und 15 min bei 70 °C (Inaktivierung). Abschließend wurde RNase H (60 units/ μ l) zugegeben, um die mRNA Matrize vom neu synthetisierten cDNA Strang abzudauen.

2.2.6. DNA- und cDNA-Amplifikation

Zur Amplifikation definierter DNA-Abschnitte wurden die unter 2.1.8. beschriebenen Oligonukleotide (Primer) in einer Konzentration von 20 nmol eingesetzt. Das Prinzip der Amplifikation beruht auf der von Kary B. Mullis 1983 entwickelten PCR (engl.: polymerase chain reaction). Die PCR besteht aus der wiederholten Denaturierung von DNA und der Anlagerung (engl.: annealing) bestimmter Startsequenzen, nämlich den spezifisch gestalteten Primern für die DNA-Polymerase. Nach Anlagerung der DNA-Polymerase startet diese mit der Amplifizierung des DNA-Abschnitts, dieser wird zu beiden Seiten von den Primern eingegrenzt. Nach der ersten Amplifizierung wiederholt sich dieser Zyklus mehrmals. Da sich in jedem Zyklus der PCR die Zahl der DNA-Matrizen verdoppelt, ergibt sich eine exponentielle Amplifizierung des ursprünglichen DNA-Abschnitts. Für jede PCR wurde jeweils folgender Zyklus gewählt, wobei sich die Hybridisierungstemperaturen bei den einzelnen Primern unterschieden haben: 5 min Denaturierung bei 94 °C, 30 sec Denaturierung bei 94 °C, 30 sec Hybridisierung bei 68,4 °C (ALK-Primer), bzw. 59,3 °C (Gapdh-Primer), bzw. 59 °C (MYCN-Primer), bzw. 59,4 °C (pgk-Primer), dann 30 sec Amplifikation bei 72 °C und schließlich 10 min finale Amplifikation bei 72 °C.

2.2.7. Semiquantitative RT-PCR

Die semiquantitative RT-PCR dient zur relativen Quantifizierung der in der RT-Reaktion in cDNA umgeschriebenen Transkripte. Hierzu werden die zu untersuchenden Transkripte in der PCR-Reaktion amplifiziert. Die Menge des Ziel-PCR-Produkts wird dann in Relation gesetzt zur Menge des PCR-Produkts aus der ubiquitär exprimierten Glyceraldehyd-Phosphat-Dehydrogenase (Gapdh) (Mülhardt 2003). Zur Durchführung der PCR wurden 2 µl 10x PCR-Puffer, je 1 µl Primer (10 pM), je 0,5 µl Gapdh-Primer (10 pM), 0,56 µl dNTP (10 mM), 13,8 µl und 0,13 µl AmpliTaq Gold Polymerase mit 0,8 µl cDNA gemischt. Um die cDNA Doppelstränge voneinander zu trennen und eventuelle Sekundärstrukturen aufzubrechen, wurde zunächst für 5 min auf 94 °C erhitzt (Denaturierung). Dann wurde die Temperatur für 30 sec auf 58,2 °C erniedrigt, da dies die optimale Temperatur zur Bindung der verwendeten Primer an die cDNA ist (Annealing). Danach wurde die Temperatur erneut für 60 sec auf 72 °C erhöht. Bei dieser Temperatur liegt das Aktivitätsmaximum der Taq Polymerase, die ausgehend von den Primern den komplementären DNA-Strang synthetisiert (Elongation). Die PCR wurde fortgesetzt mit einem weiteren 10 sec dauerndem Denaturierungsschritt, bei dem sich die Stränge erneut trennen. Dieser PCR-Zyklus wurde 30mal wiederholt und mit einem 10minütigen Elongationsschritt bei 72 °C beendet.

2.2.8. Quantitative Echtzeit-PCR

Bei der Echtzeit-PCR kann bei jedem Amplifikationszyklus der Zuwachs des Reaktionsproduktes gemessen werden. Dazu wird dem konventionellen PCR-Ansatz ein Fluoreszenzfarbstoff, SYBR-Green, zugesetzt. Dieser Farbstoff

interkaliert nur mit doppelsträngiger DNA und emittiert in diesem Zustand nach Anregung ein Fluoreszenzsignal. Nach jedem PCR-Zyklus wird die Fluoreszenz gemessen, die mit dem gebildeten PCR-Produkt korreliert. Innerhalb der exponentiellen Phase der PCR ist die Fluoreszenz proportional zur eingesetzten Menge an Matrize. Zur Auswertung wurde der so genannte C_T -Wert (engl.: threshold cycle) bestimmt, hierbei handelt es sich um die Anzahl der Zyklen, bei der die gemessene Fluoreszenz erstmals einen bestimmten Schwellenwert überschreitet. Der C_T -Wert gibt also an, ab welchem Punkt die Fluoreszenz einen Schwellenwert übersteigt. Je geringer der C_T -Wert, desto mehr Matrize war zu Beginn der PCR zur Verfügung und umgekehrt. Da cDNA als Matrize genutzt wurde, konnte so auf die Menge an Transkript und die Regulation eines Gens geschlossen werden. Es wurden das StepOne Plus Real-time-PCR System von Applied Biosystems genutzt, sowie Oligonukleotide und Lösungen von Qiagen. Die Materialien wurden nach Herstellerangaben genutzt.

2.2.9. Agarose-Gelelektrophorese

Zur Darstellung der Ergebnisse, beispielsweise einer semiquantitativen PCR, wurde die PCR-Reaktion nach Ablauf der PCR-Zyklen gekühlt und 1:20 mit Ladepuffer vermischt. Zuvor wurde ein 1,5%iges Agarose-Gel hergestellt, indem die entsprechende Menge Agarose in TAE Puffer aufgenommen und in der Mikrowelle bis zur vollständigen Auflösung erhitzt wurde. Nachdem das Gel auf ca. 70 °C abgekühlt war, wurden pro 100ml Gel 4 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) zugegeben und die Lösung in eine Gel-Aparatur gegossen. Entsprechend der Probenanzahl und des Probenvolumens wurde der entsprechende Kamm eingesetzt. Nach Erhärten des Gels wurde es in eine

Elektrophoresekammer überführt, mit 1x TAE Puffer überschichtet und der Kamm entfernt. Nun wurde das Gel mit der Probe beladen. Die Elektrophorese wurde dann für 1 h bei 120 V durchgeführt. Da die im Gel der Länge nach aufgetrennte DNA mit dem interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid gefärbt wird, kann sie unter UV-Licht angeschaut und photographiert werden.

2.2.10. Präparation von Plasmid-DNA

Es wurde der HiSpeed® Plasmid Mini-, bzw. Maxi-Kit (Qiagen) verwendet. Hierbei findet eine modifizierte alkaline Lyse statt, gefolgt von der Bindung der Plasmid-DNA an Anionen-Austausch-Harze bei niedrigem Salz- und pH-Gehalt. Das bakterielle Genom wird aussortiert, da die chromosomale DNA aufgrund ihrer Größe, Struktur und Verankerung mit den Zellresten abzentrifugiert wird. RNA, Proteine, Färbemittel und Verunreinigungen mit niedrigem Molekulargewicht werden durch einen Waschschrift mit einem mittleren Salz entfernt. Die Plasmid-DNA wird in einem Puffer mit hohem Salzgehalt ausgelöst, konzentriert und durch eine Präzipitation mit Isopropanol entsalzt. Es müssen keine toxischen Reagenzien wie Phenol oder Ethidiumbromid eingesetzt werden. Es wurde nach dem Protokoll des HiSpeed® Plasmid Mini, bzw. Maxi-Kit (Quiagen) vorgegangen: Eine einzelne Bakterienkolonie wurde von einer zuvor über Nacht bebrüteten LB Agar-Selektionsplatte gepickt und in 200 ml LB Medium, versetzt mit dem jeweiligen Selektionsantibiotikum, gegeben und für 12 - 16 Stunden bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Hiernach wurde die Bakterienkultur für 15 min bei 6000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurden komplett entfernt durch umdrehen des geöffneten 50 ml Sammel tubes. Ein Pellet enthielt etwa $3-4 \times 10.000.000.000$ Bakterien / ml. Das Pellet wurde

in 10 ml P1 Puffer (im Kit enthalten, enthält RNase A) resuspendiert, geschüttelt und kräftig gevortext. Es wurden 10 ml P2 Puffer (im Kit enthalten, enthält Natriumhydroxid) hinzugegeben und der Inhalt vorsichtig durch 4 bis 6maliges Umdrehen des geschlossenen Sammel tubes vermischt und für 5 min bei RT inkubiert. Während der Inkubation wurde die QIAfilter® Patrone (im Kit enthalten) vorbereitet und in einem Sammel tube platziert. Im nächsten Schritt wurden 10 ml gekühlter P3 Puffer (im Kit enthalten) zu dem Lysat hinzugegeben. Ein sofortiges Mischen durch 4 bis 6maliges Umdrehen des verschlossenen Tubes ist wichtig. Das Lysat wurde direkt in die vorbereitete QIAfilter® Patrone gegeben und für 10 min bei RT inkubiert. Durch die Zugabe von P3 Puffer bildete sich ein weißes Präzipitat, das genomische DNA, Proteine und Zelldebris enthielt. Während der Inkubation wurde der HiSpeed® Maxi Tip (im Kit enthalten) durch Anfeuchten der Matrix equilibriert: 10 ml QBT Puffer (im Kit enthalten, enthält Isopropanol) durchliefen die Matrix aufgrund der Gravität. Nun wurde der äußere Verschluss des QIAfilter® abgenommen und das Zellysat durch vorsichtiges Einführen des Kolbens in die QIAfilter® Patrone in den zuvor equilibrierten Tip gegeben. Hierdurch enthielt der Tip ca. 25 ml Lysat, das diesen ebenfalls aufgrund der Gravität durchlief. Dann wurden 20 ml QB Puffer (im Kit enthalten, enthält Isopropanol) zum Waschen auf den Tip gegeben und ebenfalls der Gravität überlassen. Im nächsten Schritt wurde die DNA mit 15 ml QF Puffer (im Kit enthalten, enthält Isopropanol) gelöst und in einem 30 ml Tube gesammelt, um dann mit 10,5 ml Isopropanol präzipitiert zu werden. Hierfür wurde der Inhalt gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Während der Inkubation wurde aus einer 30 ml Spritze der Kolben genommen und ein QIAprecipitator® Maxi Modul vorne auf die Spritze aufgesetzt. Die

Mischung aus gelöster DNA und Isopropanol wurde über einem Abwurf durch den Präzipitator gepresst. Auf die gleiche Art wurden 2 ml 70%iger Ethanol durch den Präzipitator gepreßt und verworfen. Hiernach folgte 2 bis 3maliges Durchpressen von Luft durch den Präzipitator zum Trocknen der Membran. Im letzten Schritt wurde der Präzipitator auf die Spitze einer 5 ml Spritze aufgesetzt und die Plasmid-DNA in 1 ml TE Puffer (im Kit enthalten, enthält EDTA) aufgenommen. Die DNA-Konzentration wurde am NanoDrop Spektrophotometer gemessen.

2.2.11. Klonierung

Unter Klonierung versteht man die Einführung eines zuvor sequenzierten DNA-Fragmentes in einen Vektor, der dann die massenhafte Vermehrung dieser DNA ermöglicht. Bei diesem Vektor handelt es sich in der Regel um einen Expressionsvektor. Vektor und DNA-Fragment werden zunächst mittels Restriktionsenzymen verdaut, daraufhin in einer Phosphatase-Reaktion gereinigt, im nächsten Schritt miteinander ligiert und schließlich in Bakterien transformiert. Im Rahmen dieser Arbeit kam der pMSCVpuro-attR-Vektor zum Einsatz. Er diente als Shuttle-Vektor zwischen *E. coli* und JoMa1 NLSZ. In die MCS (engl.: multiple cloning site) einklonierte attR-Stellen verleihen diesem Vektor Kompatibilität mit dem sog. Gateway®-System. Ein an den attR-Stellen inseriertes GOI (engl.: gene of interest) steht unter Kontrolle der speziell gestalteten 5'-LTR-Region (engl.: long term repeats), die eine hohe Transkription des inserierten Gens garantieren. Das Amp^r-Gen kodiert für das Ampicillin-Resistenzgen β -Lactamase und dient zur Selektion in *E. coli*. Das durch den murinen pgk-Promotor (engl.: phosho glycerat kinase) kontrollierte Puro^r-Gen

kodiert für eine Resistenz gegenüber dem translationshemmenden Antibiotikum Puromycin und dient der Selektion in eukaryotischen Zellen. Die für die eigenständige Replikation des pMSCVpuro-attR-Vektors notwendigen viralen Gene sind nicht kodiert (Abb.7).

Gateway®-System für Klonierungen

Die Gateway®-Klonierungsmethode beruht auf dem Rekombinasesystem des Phagen λ und den Rekombinationssequenzen (engl.: attachment sites) dieses Systems. Im Gegensatz zur herkömmlichen Klonierung findet hier die Selektion mittels Antibiotikaresistenz und einem Gen, das für einen Gyrasehemmer kodiert, statt, dies führt zu einer besonders hohen Effizienz der Klonierung. Die Gateway®-Klonierung wurde genutzt, um GOI (engl.: genes of interest, es handelte sich um EGFP, MYCN und ALK^{F1174L}) aus verschiedenen Donorvektoren in den für alle Transfektionen mit JoMa1 genutzten Zielvektor pMSCVpuro-attR zu klonieren. Es wurde nach Herstellerangaben gearbeitet. Der verwendete Bakterienstamm war Escherichia coli (E. coli) TOP10, Genotyp F-mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (ara-leu) 7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG λ -E. coli. TOP10 E. coli ist ein chemisch kompetenter Stamm der Firma Invitrogen. Er ist besonders für die Replikation von High-Copy-Plasmiden geeignet. Der Stamm wurde genutzt, um die verwendeten Plasmide zu replizieren und dadurch größere Menge Plasmid-DNA zu gewinnen.

Restriktionsanalyse von Plasmid-DNA

Restriktionsenzyme, auch Restriktionsendonukleasen genannt, spalten

hydrolytisch die Phosphodiesterbindungen an doppelsträngiger DNA. Zur Überprüfung der Integration verschiedener Gene in den Vektor wurden die Restriktionsenzyme EcoR1, Xho1 und Hpa1 eingesetzt. Neben 10 µg Vektor-DNA wurden 0,5 µl der jeweiligen Restriktionsendonukleasen, 2 µl NEB2-Puffer (10x), sowie 2 µl BSA mit Aqua destillata auf 20 µl aufgefüllt und für 1-2 h bei 37°C inkubiert. Das Ergebnis des jeweiligen Verdaus wurde mittels Agarose Gelelektrophorese überprüft. Die elektrophoretische Auftrennung der unterschiedlich langen Fragmente zeigt ein charakteristisches Schnittmuster für einen Vektor mit, bzw. ohne integrierten DNA-Abschnitt. Daraufhin wurde das gewünschte DNA-Fragment mit Hilfe des NucleoSpin® Extract II Kit (Macherey-Nagel) aus dem Agarosegel isoliert. Hierbei wird sich zu Nutze gemacht, dass DNA in Gegenwart von chaotrophen Salzen an eine Silikamembran bindet. In einem Waschschrift wurden Verunreinigungen mit Ethanol entfernt. In einem weiteren Schritt wurde die DNA mit einem alkalischen Puffer eluiert. Zuletzt wurde die Konzentration der eluierten DNA photometrisch am NanoDrop Spektrophotometer bestimmt.

Ligation von DNA

Zur Ligation von DNA-Fragmenten und Plasmiden wurde die T4 DNA-Ligase eingesetzt. Diese Ligase katalysiert die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen einem 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxyende der DNA. Die Produkte der Ligation wurden für Restriktionsanalysen und für die Hitzeschocktransformation mit E. coli verwendet. Es wurden die T4 DNA-Ligase und der mitgelieferte Puffer der Firma Fermentas nach Herstellerangaben genutzt, dies entsprach folgendem Ansatz: 20 ng linearisierter Vektor, 100 ng (5facher Überschuss) der

zu inserierenden DNA, 2 µl T4 DNA-Ligase Puffer (10x), 10 units T4 DNA-Ligase und 20 µl Aqua destillata.

Hitzeschocktransformation von E. coli

Die direkte Aufnahme von DNA-Molekülen und die stabile Weitergabe dieser Information wird Transformation genannt. Um Plasmid-DNA in den TOP10 E. coli Stamm einzuschleusen, wurde die Hitzeschocktransformation genutzt. Dabei wurde nach dem Protokoll des Herstellers für die TOP10-Hitzeschocktransformation vorgegangen. Die Hitzeschocktransformation basiert auf dem Prinzip, daß die Membran der Bakterien durch einen 30sekündigen Hitzeschock destabilisiert wird und die einzuschleusende Plasmid-DNA durch die destabilisierte Membran in das Bakterium eindringen kann. Um die so hergestellten Klone vermehren zu können, waren im Vorfeld Platten mit LB-Agar ausgegossen worden, diese wurden nun mit den transformierten E. coli bestrichen und für mindestens 12 h bei 37 °C inkubiert. Zur Sicherung, dass nur die gewünschten Klone wachsen können, war dem LB-Medium Ampicillin in einer Endkonzentration von 150 µg / ml zugegeben worden. Es konnten nun verschiedene Kolonien von den Platten gepickt und in ebenfalls mit Penicillin versetztem LB-Medium bei 37 °C und 200 rpm für 12 -16 h inkubiert werden. Die Aufreinigung der Plasmide erfolgte nach dem Protokoll des Qiagen® Maxi-Kit. Der DNA-Gehalt wurde am NanoDrop Spektrophotometer gemessen.

2.2.12. Transfektion von JoMa1 Neuralleistenstammzellen

Es wurde sich der Methode der Elektroporation bedient. Die Elektroporation dient der Einbringung von DNA in Form eines Plasmids, bzw. eines Vektors in

Zellen der Wahl. Durch einen kurzen elektrischen Impuls wird die Zellmembran der Zielzellen kurzfristig permeabilisiert, wodurch die DNA aus der Lösung ins Zellinnere passieren kann (Alberts et al. 2002). Es wurde der Microporator MP 100 (Digital Bio) verwendet und nach dem dazu gehörigen „Optimization quick protocol“ Protokoll vorgegangen. Die Elektroporation wurde dabei in einer 10 µl Kapillare durchgeführt, die Kapillare hat den Vorteil, daß die Oberflächengröße der Elektroden geringer ist und zugleich deren Abstand größer, im Vergleich zu einer herkömmlichen Küvette. Durch diese Unterschiede wird die Bildung von Hitze und Metalloxiden, die den pH-Wert beeinflussen, reduziert. Zur ersten Kontrolle der Effizienz der Elektroporation diente die Transfektion von JoMa1 mit pMSCVpuro-EGFP. Die Transfektionseffizienz ergab sich aus dem Verhältnis zwischen JoMa1 Zellen, die durch die Expression von EGFP fluoreszieren und den nicht fluoreszierenden Zellen im Sichtfeld. Für die Elektroporation wurden folgende Parameter genutzt: 1425 V Spannung, 30ms Impulslänge, 1fache Impulszahl, je 1 µg pMSCVpuro-GOI (verwendete GOI waren EGFP, MYCN und ALK^{F1174L}) pro 10 µl Elektroporationsansatz und 10⁵ Zellen pro 10 µl Elektroporationsansatz.

2.2.13. Transplantation von JoMa1 NLSZ und deren Derivaten in Nacktmäuse

Es wurden 2 x 10⁷ der angegebenen Zelllinie pro Maus vorbereitet und transplantiert. Es wurden nicht transfizierte JoMa1, JoMa1-MYCN, JoMa1-EGFP und JoMa1-ALK^{F1174L} transplantiert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, abtrypsiniert und für 3 min mit 800 x g zentrifugiert, die Bremsen der Zentrifuge waren ausgestellt. Die so erhaltenen Pellets wurden in Matrigel (BD Biosciences) resuspendiert und auf Eis gestellt. Pro Maus wurden 2 x 10⁷ Zellen

in 200 µl Matrigel s. c. jeweils in die linke Flanke injiziert. In einem späteren Schritt wurden JoMa-MYCN-T1 bis JoMa1-MYCN-T4, sowie JoMa1- ALK^{F1174L}-T1 und JoMa1-ALK^{F1174L}-T2 auf gleiche Art vorbereitet und in selber Anzahl in weitere immundefiziente Nacktmäuse injiziert.

2.2.14. Herstellung von Gewebeschnitten aus Tumoren

Die jeweilige Tumorgroße wurde mittels eines digitalen Meßtasters gemessen, um das Volumen errechnen zu können. Die Mäuse wurden an Tag 150 nach Transplantation, bzw. sobald der Tumor ein Volumen von 1000 mm³ erreicht hatte, durch Genickbruch getötet und mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Die Tumoren wurden unter sterilen Bedingungen entfernt und mit physiologischer Kochsalzlösung abgespült. Hiernach wurden sie für 2-3 Tage in Formaldehyd fixiert. Mithilfe der Einbettstation Citadel 1000 (Thermo Shandon) wurden die Tumoren wie folgt behandelt: 1 h in 70%igem Ethanol, 1 h in 80%igem Ethanol, in zwei Schritten jeweils 1 h in 96%igem Ethanol, in zwei Schritten jeweils 1 h in 100%igem Ethanol, für 1 h in Aceton, erneut für 1 ½ h in Aceton (aufsteigende Alkoholreihe zwecks Dehydrierung), für 1 ½ h in Xylol (Klärung) und in den letzten drei Schritten jeweils für 1 ½ , 2 und 3 h in Paraffin. Die in Paraffin eingebetteten Tumorböcke wurden in erkaltetem Zustand am Mikrotom (Leica) in ca. 10 µm dünne Schnitte geschnitten. Gefärbt wurden die Tumoren mittels einer Hämatoxylin-Eosin (HE-)-Färbung, diese Färbung stellt eine Universalfärbung in der Histologie und Pathohistologie dar. Der basische Farbstoff Hämatoxylin färbt saure Strukturen wie z.B. die Nukleinsäuren im Zellkern intensiv blau an, man spricht von basophilen Strukturen. Der saure Farbstoff Eosin stellt basische Komponenten wie z.B. das Zytoplasma

(Mitochondrien, Sekretgranula) der Zelle und bindegewebige Fasern rötlich dar, man spricht von eosinophilen, bzw. azidophilen Strukturen. Nach erneuter Dehydrierung durch aufsteigende Alkoholreihen und Klärung durch Xylol, wurden auf die entwässerten Schnitte Deckgläser geklebt.

2.2.15. Echtzeit-Zellanalyse mittels Impedanzmessung

Zur Echtzeit-Zellanalyse der isolierten murinen Tumorzelllinien mittels Impedanzmessung wurde sich des xCELLigence®-Systems (Roche Applied Science / ACEA Biosciences Inc.) bedient. Überprüft wurde die Auswirkung von NBT-272, einen Inhibitor von Proteinen der MYC-Familie (von Bueren et al. 2007), auf das Proliferationsverhalten der Tumorzelllinien. Es wurde nach Herstellerangaben vorgegangen.

3. Ergebnisse

3.1. Kultur und Transfektion von JoMa1 Neuralleistenstammzellen

Schon seit längerem wird diskutiert, ob es sich bei Neuralleistenstammzellen (NLSZ) um die Ursprungszelle von Neuroblastomen handeln könnte. Um jedoch experimentell nachweisen zu können, daß Neuralleistenstammzellen tatsächlich die Ursprungszellen von Neuroblastomen sein können, müssen diese Zellen eindeutig vor ihrer Transformation identifiziert werden. Die Neuralleistenstammzelllinie JoMa1 wird durch Kultur in einem bestimmten Medium und durch eine niedrige Expression von konditional aktivem c-Myc in einem undifferenzierten Zustand gehalten (Maurer et al. 2007), ohne dabei transformiert zu werden (Jäger et al. 2004). Die Expression der Marker p75 und SOX10 als Marker der undifferenzierten Neuralleiste, bestätigt, daß es sich bei JoMa1 um Neuralleistenprogenitorzellen handelt (Maurer 2007). Außerdem lassen sich JoMa1 Zellen unter bestimmten Bedingungen in alle Derivate der Neuralleiste differenzieren.

Zunächst wurden JoMa1 NLSZ stabil kultiviert. Um ein Überleben der JoMa1 NLSZ sichern zu können, wird unter anderem Hühnerembryonenextrakt (HEE) als Zusatz für das NLSZ Kulturmedium benötigt. So bestand der erste Schritt zur stabilen Kultivierung von JoMa1 NLSZ darin, HEE herzustellen. Hierfür wurde ein Protokoll von Mahendra Rao in leicht modifizierter Form verwendet (Rao 1997 (vergleiche Maurer 2007)). Um die Qualität von kommerziell verfügbarem und selbst hergestelltem HEE zu untersuchen, führten wir MTT Viabilitätstests durch. Es zeigte sich eine signifikant verringerte Proliferation von JoMa1 Zellen, die in NLSZ Medium kultiviert wurden, welches kommerziell erhältlichen HEE enthielt (Abb.6a+b). Die Qualität des in Bonn hergestellten HEE und des in Essen

hergestellten HEE variierten nicht erheblich. Der komplette Vorgang der Herstellung des HEE vom bebrüteten Hühnerei bis hin zum fertig gefilterten Extrakt wurde erstmalig in Form eines Video Artikels im Journal of Visualized Experiments veröffentlicht (Pajtler und Bohrer 2010).

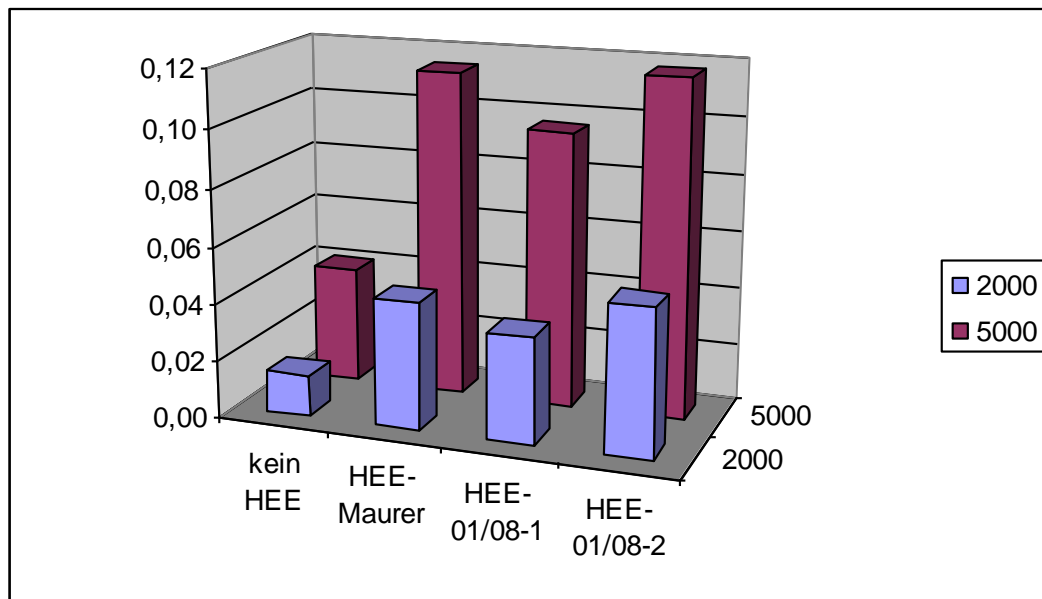


Abb.6a: MTT-Proliferationsassays zur Untersuchung der Auswirkung verschiedener Hühnerembryonenextrakte (HEE) auf das Proliferationsverhalten von JoMa1. JoMa1 Zellen auf mit Fibronektin benetzten 96 Loch Gewebekulturplatten, rot = 5000 Zellen / well, blau = 2000 Zellen / well. Die Messung erfolgte 24h nach Beginn der Inkulturnahme. JoMa1, denen kein HEE über das Medium zugeführt wurde, zeigten ein deutlich schlechteres Proliferationsverhalten, als solche, denen HEE zugeführt wurde. Die Qualität des in Bonn hergestellten HEE, HEE-Maurer, und die des in Essen hergestellten HEE, HEE-01/08-1 und HEE-01/08-2, variierten nicht erheblich.

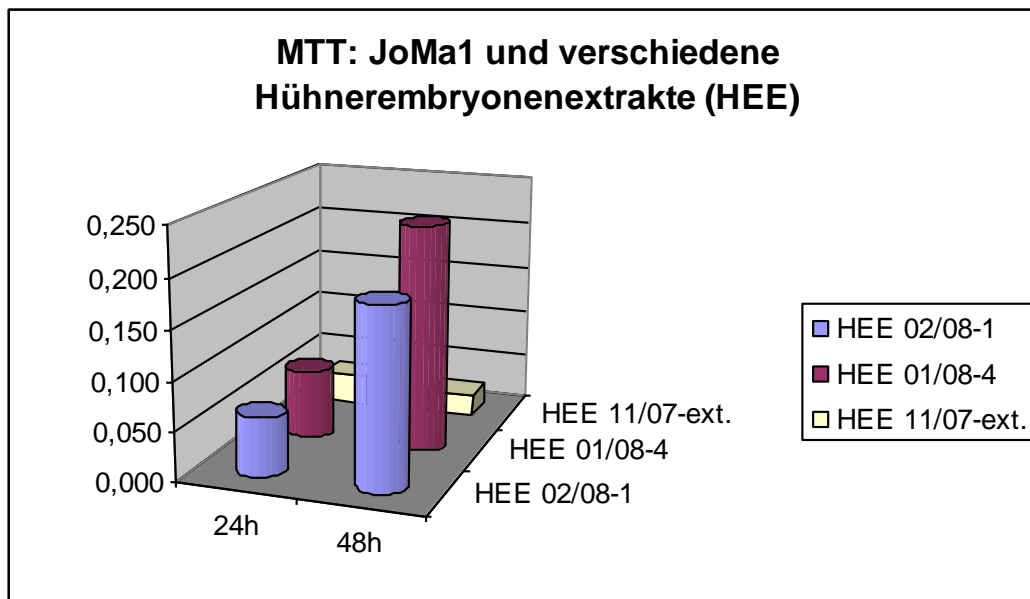


Abb.6b: MTT-Proliferationsassays zur Untersuchung der Auswirkung verschiedener Hühnerembryonenextrakte (HEE) auf das Proliferationsverhalten von JoMa1. HEE hergestellt nach dem modifizierten Protokoll von Mahendra Rao (Rao 1997 (vergleiche Maurer 2007)) führte, im Gegensatz zu extern erworbenem HEE, HEE-ext., zu deutlich besseren Proliferationsraten von JoMa1.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob JoMa1 NLSZ stabil transfizierbar sind. In den Vektor pMSCVpuro-attR wurden mit Hilfe eines Rekombinase mediierten Systems die folgenden cDNAs eingebaut: MYCN-cDNA, ALK^{F1174L}-cDNA und EGFP-cDNA (Abb. 7). Die cDNA Sequenz der Vektoren pMSCVpuro-MYCN, pMSCVpuro- ALK^{F1174L} und pMSCVpuro-EGFP, wurde zunächst mittels Sequenzierung überprüft. Als Methode zur Einbringung der DNA in die JoMa1 dienten Elektroporation und Lipofektion. Die resultierenden Zelllinien wurden JoMa1-MYCN, JoMa1- ALK^{F1174L} und JoMa1-EGFP genannt. Zur ersten Kontrolle der Transfektionseffizienz konnten mit EGFP transfizierte JoMa1 mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden. Schon vor Beginn der Selektion

mittels eines Selektionsantibiotikums expremierten >80% der Zellen EGFP, dies weist auf eine hohe Transfektionseffizienz hin (Abb.8). Als Selektionsantibiotikum diente das translationshemmende Puromycin, welches in einer Konzentration von 1 µg/ml eingesetzt wurde. Das durch den murinen pgk-Promotor kontrollierte Puro^r-Gen kodiert für eine Resistenz gegenüber Puromycin, somit gingen nur die erfolgreich mit dem Vektor pMSCVpuro transfizierten Zellen nicht in den Zelltod über.

Die Kontrolle der Effizienz der Transfektion mit MYCN und mit ALK^{F1174L} erfolgte anhand von semiquantitativer Real-Time PCR. So konnte gezeigt werden, daß es in den mit pMSCVpuro-MYCN transfizierten JoMa1, also in JoMa1-MYCN, auf mRNA Ebene zu einer stabilen Expression von MYCN kam. Im Gegensatz dazu wiesen die nicht transfizierten JoMa1, keine erhöhte Expression von MYCN auf (Abb.9). Die Anwesenheit der Vektoren pMSCVpuro-MYCN, pMSCVpuro-ALK^{F1174L} und pMSCVpuro-EGFP wurde zusätzlich mittels PCR bestätigt, indem eine für den Vektor pMSCVpuro-attR spezifische Sequenz, *pgk*, in der DNA, isoliert aus den JoMa1, die zuvor mit der jeweils indizierten cDNA transfiziert wurden, nachgewiesen werden konnte (Abb.10).

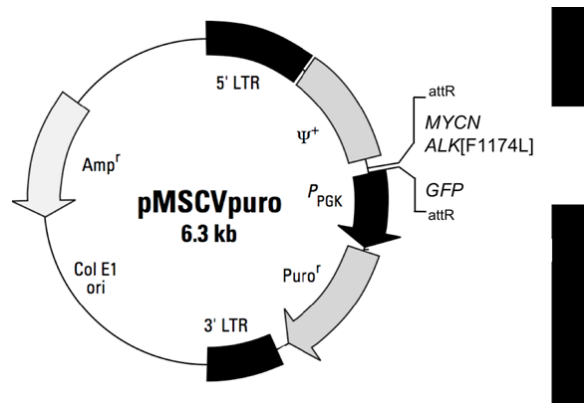


Abb.7: Detaillierte Vektorkarte von pMSCVpuro-attR mit inseriertem MYCN, ALK^{F1174L} oder EGFP. Der Vektor trägt eine Ampicillin- sowie eine Puromycinresistenz zur Selektion in Pro- und Eukaryoten. Daneben sind auch die Gene bzw. Sequenzen, die zur viralen Integration notwendig sind, vorhanden (Clontech Datenblatt). Ein gewöhnlicher ‚backbone‘ diente zur Einbringung der jeweils gewünschten cDNA. Es wurde MYCN-cDNA, ALK^{F1174L}-cDNA und EGFP-cDNA eingeführt, letztere ließ eine erste Kontrolle der Transfektionseffizienz mittels Fluoreszenzmikroskopie zu.

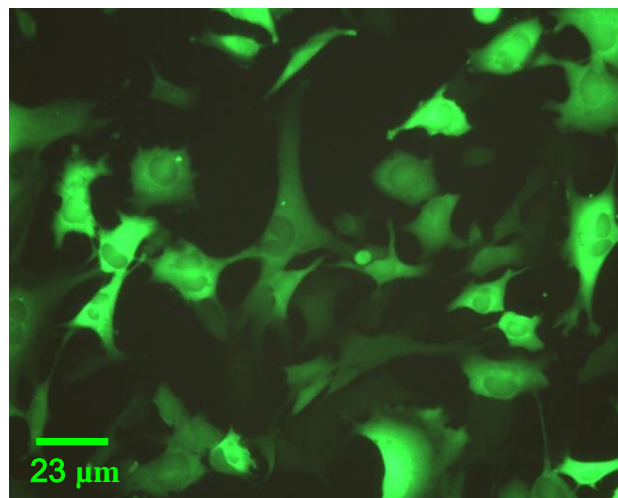


Abb.8: JoMa1 Neuralleistenstammzellen lassen sich mit Hilfe des Vektors pMSCVpuro-EGFP transfizieren. Funktionelle Expression von EGFP konnte durch Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden. Die Zellen wurden mittels Elektroporation mit pMSCVpuro-EGFP transfiziert und unter für Neuralleistenstammzellen normalen Bedingungen kultiviert, hier JoMa1-EGFP 48 h nach der Transfektion.

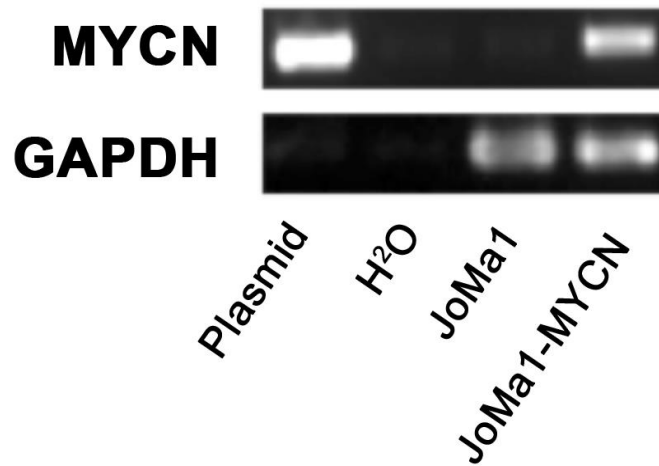


Abb.9: JoMa1 NLSZ lassen sich mit Hilfe des Vektors pMSCVpuro-MYCN transfizieren. Nachweis der stabilen ektopen Expression von MYCN in JoMa1-MYCN auf mRNA Ebene mittels semiquantitativer Real-Time-PCR.

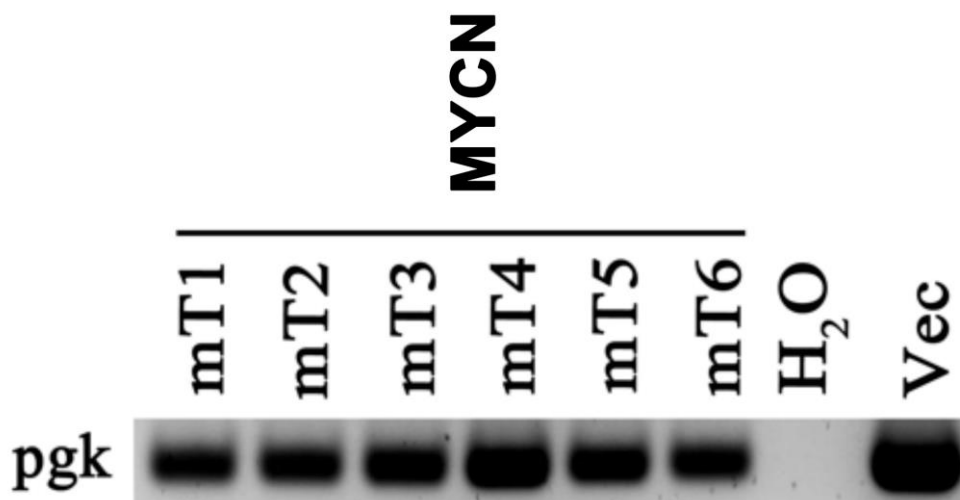


Abb.10: Stabile Integration des Vektors pMSCVpuro-attR in JoMa1. PCR zum Nachweis des Vorhandenseins einer vektorspezifischen Sequenz, *pgk*, in der DNA isoliert aus JoMa1, die mit der jeweils indizierten cDNA transfiziert wurden.

3.2. Immortalisierung von JoMa1 Neuralleistenstammzellen durch MYCN und ALK^{F1174L} *in vitro*

Es konnte gezeigt werden, daß JoMa1 Neuralleistenstammzellen (NLSZ) sowohl durch MYCN, als auch durch ALK^{F1174L} *in vitro* immortalisiert werden können. Dazu wurden alle transfizierten JoMa1 NLSZ parallel mit Medium ohne den Zusatz von 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) behandelt. Hierdurch konnte das 4-OHT-abhängige c-MycER^T-Konstrukt nicht mehr in den Zellkern der Zellen transloziert werden, so daß auf diesem Wege keine Proliferation mehr angeregt werden konnte. Normale, nicht mit einem Onkogen wie MYCN oder ALK^{F1174L} transfizierte JoMa1 NLSZ, gehen unter diesen Bedingungen ohne Erhalt eines Differenzierungsstimulus nach circa zwölf Stunden in den Zelltod über (Mauer et al. 2007). So ließ es sich auch bei den mit EGFP transfizierten NLSZ JoMa1-EGFP beobachten: 48 h nach Beendigung der 4-OHT Gabe konnten keine lebenden Zellen mehr beobachtet werden (Abb. 12).

Im Gegensatz dazu kam es sowohl bei den mit MYCN, als auch bei den mit ALK^{F1174L} transfizierten JoMa1 NLSZ, zu einer Immortalisierung der Zellen: Auch > 48 h nach Auslaß der Zugabe von 4-OHT proliferierten die Zellen weiterhin, ohne in einen differenzierten Zustand überzugehen oder zu sterben. Sowohl MYCN, als auch ALK^{F1174L}, haben die JoMa1 NLSZ immortalisiert. Die Immortalisierung der JoMa1-MYCN, sowie der JoMa1- ALK^{F1174L} *in vitro* wurde mikrophotografisch (Abb.12) und mittels MTT-Viabilityassay (Abb.13) dokumentiert.

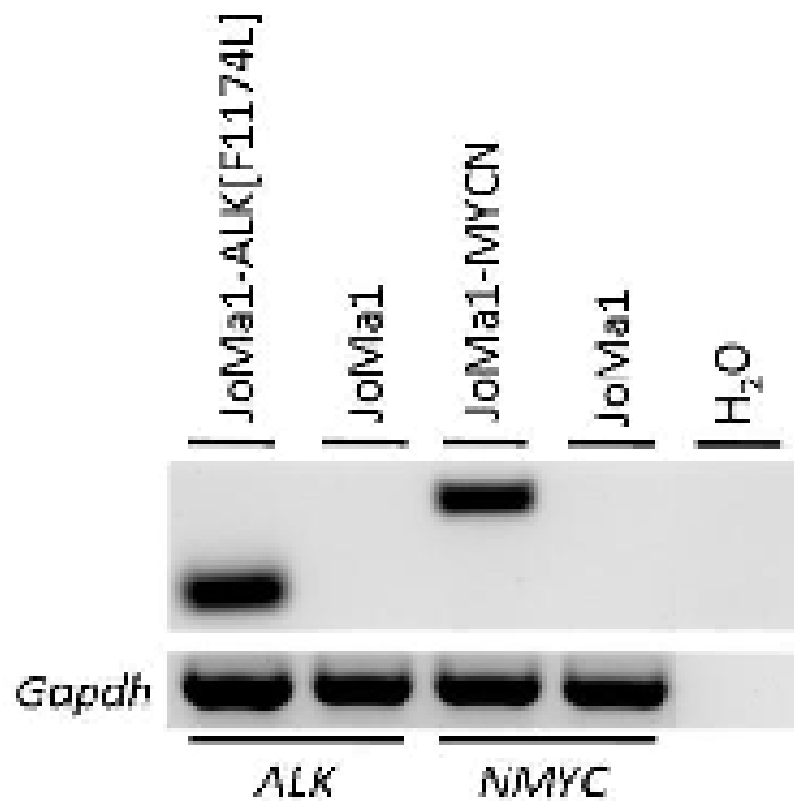


Abb.11: Semiquantitative RT-PCR bestätigte die Expression von MYCN in JoMa1-MYCN, sowie von ALK^{F1174L} in JoMa1-ALK^{F1174L} auf mRNA Ebene. Im Vergleich dazu kam es zu keiner Expression von MYCN, bzw. von ALK^{F1174L}, in den nicht transfizierten JoMa1 NLSZ.

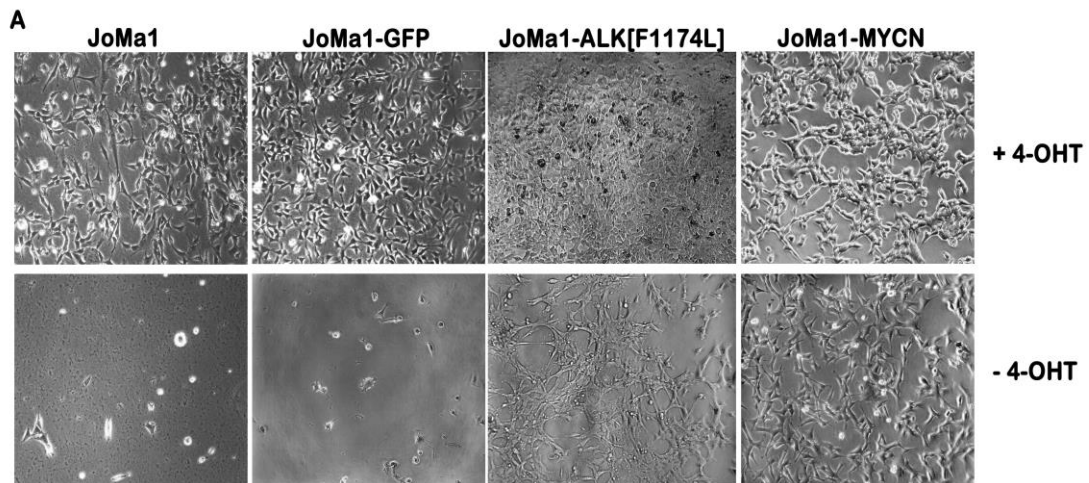


Abb.12: MYCN und ALK^{F1174L} immortalisieren JoMa1 NLSZ *in vitro*. Obere Reihe von links nach rechts: JoMa1, JoMa1-EGFP, JoMa1-ALK^{F1174L} und JoMa1-MYCN unter Kulturbedingungen mit 4-OHT, die Zellen proliferieren gut. Untere Reihe von links nach rechts: JoMa1 und JoMa1-EGFP 48 h nach Auslaß der Zugabe von 4-OHT, es sind kaum noch lebende Zellen zu sehen. JoMa1-ALK^{F1174L} und JoMa1-MYCN 48 h nach Beendigung der Zugabe von 4-OHT, man sieht weiterhin viable Zellen.

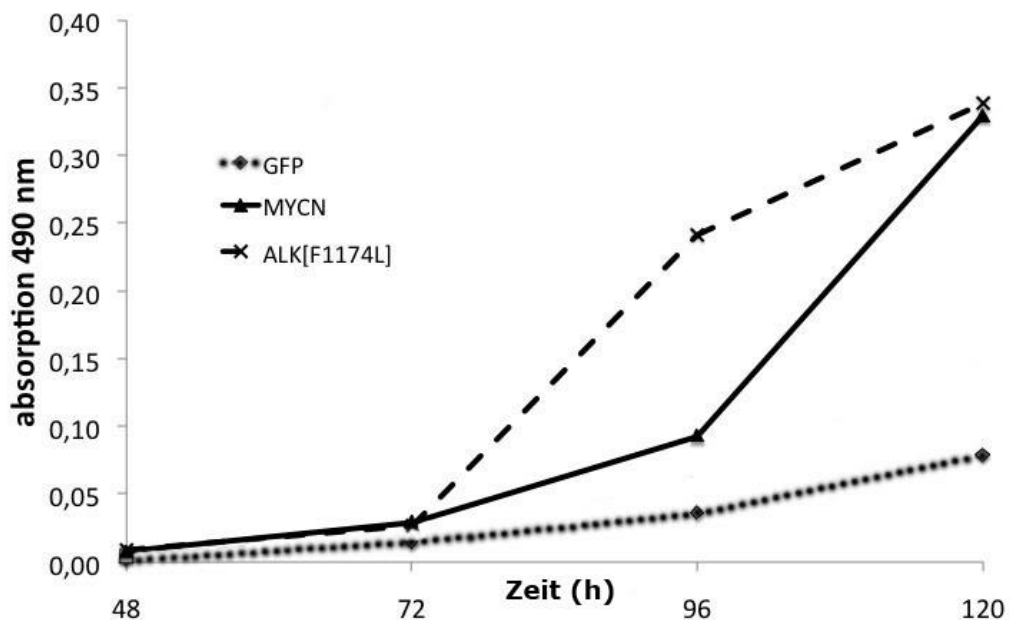


Abb.13: MTT-Viabilityassay von JoMa1-EGFP, JoMa1-MYCN und JoMa1-ALK^{F1174L}. Sowohl JoMa1-MYCN, als auch JoMa1-ALK^{F1174L} konnten in Abwesenheit von Tamoxifen (4-OHT) weiter wachsen. Im Gegensatz dazu war das Wachstum von JoMa1-EGFP in Abwesenheit von 4-OHT reduziert.

3.3. Etablierung eines Mausmodells zur Untersuchung der Tumorphagenese mit transfizierten JoMa1 Neuralleistenstammzellen

Als nächste Frage stellte sich, ob JoMa1 Neuralleistenstammzellen *in vivo* tumorigenes Potential entfalten können durch Überexpression des Onkogens MYCN, bzw. durch Überexpression des Onkogens ALK^{F1174L}. Dies würde beweisen, daß die Zellen durch o.g. Onkogene nicht nur immortalisiert, sondern tatsächlich auch transformiert werden.

3.3.1. Tumorigenität von JoMa1-MYCN und JoMa-ALK^{F1174L} *in vivo*

Die Tatsache, daß JoMa1-MYCN und JoMa-ALK^{F1174L} auch bei Inaktivierung des c-Myc^{ERT}-Konstrukt weiterhin proliferieren konnten, legte den Schluß nahe, daß eine stabile Überexpression von MYCN oder ALK^{F1174L} einen immortalisierten Phänotyp in Zellen, die humanen Neuralleistenstammzellen ähnlich sind, induzieren kann. Um zu untersuchen, ob die JoMa1 Zellen nicht nur immortalisiert, sondern auch transformiert wurden, wurde ihre Tumorigenität *in vivo* untersucht.

Zur Überprüfung ihrer Tumorigenität *in vivo* wurden jeweils 2×10^7 Zellen JoMa1-MYCN, bzw. 2×10^7 Zellen JoMa1-ALK^{F1174L} in jeweils sechs immundefiziente Nacktmäuse transplantiert. Als Kontrolle diente die Transplantation derselben Anzahl nicht transfizierter JoMa1, bzw. JoMa1-EGFP, in jeweils fünf weitere immundefiziente Nacktmäuse. Die Zeit bis zur sichtbaren Tumorentwicklung unterschied sich erheblich: Es zeigte sich, daß das Überleben der Mäuse sehr davon abhing, welche Zellen ihnen transplantiert wurden - JoMa1, JoMa1-EGFP, JoMa1-MYCN oder JoMa1-ALK^{F1174L}. So überlebten die zehn Mäuse, denen entweder nicht transfizierte JoMa1 oder JoMa1-EGFP

transplantiert wurden, zu hundert Prozent das Experiment, ohne daß sich ein Tumor bildete. Die sechs Mäuse hingegen, denen JoMa1-MYCN transplantiert wurden, mußten allesamt spätestens 123 Tagen nach Transplantation (Tx) aufgrund der Tumoren getötet werden (Abb.15). Von den sechs Mäusen, denen JoMa1-ALK^{F1174L} transplantiert wurden, mußten zwei aufgrund eines Tumors getötet werden. Bei den mit JoMa1-MYCN transplantierten Mäusen war dies im Detail zu folgenden Zeitpunkten nach Transplantation der Fall: Maus3-MYCN mußte an Tag 43 getötet werden, Maus4-MYCN an Tag 50, Maus5-MYCN an Tag 57, Maus6-MYCN an Tag 64, Maus1-MYCN an Tag 106 und zuletzt Maus2-MYCN an Tag 123. Bei den beiden mit JoMa1-ALK^{F1174L} transplantierten Mäusen, in denen sich Tumoren formierten, mußte Maus1-ALK an Tag 48 und Maus2-ALK ebenfalls an Tag 48 getötet werden (Tab.4; Abb.15). Während es somit in den zehn Kontrollmäusen zu gar keiner Tumormutation kam, induzierten JoMa1-MYCN in sechs von sechs Mäusen *in vivo* Tumoren, aufgrund derer diese an Tag 43 bis 123 nach Transplantation getötet werden mußten. JoMa1-ALK^{F1174L} induzierten in zwei von sechs Mäusen *in vivo* Tumoren, aufgrund derer diese beide an Tag 48 getötet werden mußten. Die Tumoren wurden JoMa1-MYCN-T1 bis JoMa1-MYCN-T6, sowie JoMa1-ALK^{F1174L}-T1 und JoMa1-ALK^{F1174L}-T2 genannt (Tab.5).



Abb.14: JoMa1-MYCN induzieren Tumoren *in vivo*. Maus1-MYCN an Tag 106 nach Transplantation (Tx) von JoMa1-MYCN, Maus2-MYCN an Tag 123 nach Tx von JoMa1-MYCN.

Zellen	Tumorinduktion
JoMa1	0 / 5
JoMa1-EGFP	0 / 5
JoMa1-MYCN	6 / 6
JoMa1- ALK ^{F1174L}	2 / 6

Tab.3: JoMa1-MYCN und JoMa1-ALK^{F1174L} sind tumorigen *in vivo*. In allen sechs immunindefizienten Nacktmäusen, denen JoMa1-MYCN transplantiert wurden, kam es zur Induktion von Tumoren (6/6). In zwei von sechs immundefizienten Nacktmäusen, denen JoMa1-ALK^{F1174L} transplantiert worden sind, kam es ebenfalls zur Induktion von Tumoren (2/6). Im Gegensatz dazu wurden weder durch die Transplantation nicht transfizierter JoMa1 (0/5), noch durch die Transplantation von JoMa1-EGFP (0/5), Tumoren induziert.

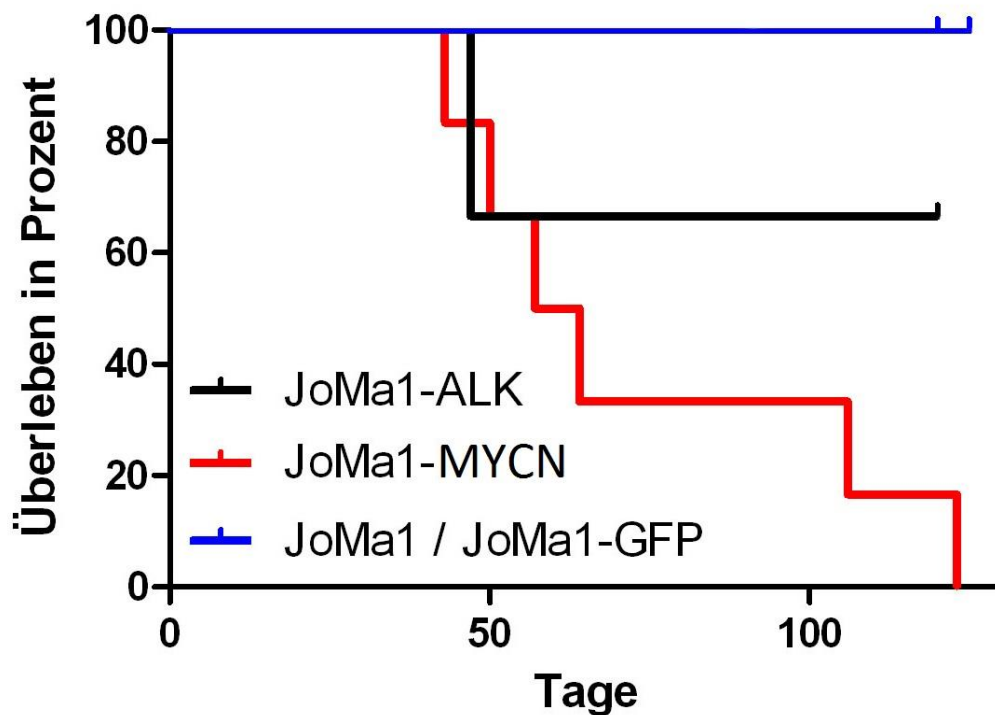


Abb.15: Überleben von Immundefizienten Nacktmäusen in Abhängigkeit der transplantierten Zellen JoMa1, JoMa1-EGFP, JoMa1-MYCN und JoMa1-ALK^{F1174L}. Die blaue Linie der Kaplan-Meier-Kurve zeigt das Überleben der Mäuse transplantiert mit nicht transfizierten JoMa1 und JoMa1-EGFP: Auch über 125 Tagen nach Transplantation der Zellen wurde das Überleben der Mäuse nicht beeinträchtigt. Die rote Linie zeigt das Überleben der Mäuse transplantiert mit JoMa1-MYCN: Die letzte Maus (Maus2-MYCN) mußte an Tag 123 nach Transplantation getötet werden (Maus3-MYCN an Tag 43, Maus4-MYCN an Tag 50, Maus5-MYCN an Tag 57, Maus6-MYCN an Tag 64, Maus1-MYCN an Tag 106 und Maus2-MYCN an Tag 123). Die schwarze Linie zeigt das Überleben der Mäuse transplantiert mit JoMa1-ALK^{F1174L}: Zwei von sechs Mäusen mußten auf Grund eines Tumors getötet werden, Maus1-ALK^{F1174L} an Tag 48 und Maus2-ALK^{F1174L} ebenfalls an Tag 48.

Bezeichnung Maus	Transplantierte NLSZ	Todeszeitpunkt nach Tx
Maus1-MYCN	JoMa1-MYCN	Tag 106
Maus2-MYCN	JoMa1-MYCN	Tag 123
Maus3-MYCN	JoMa1-MYCN	Tag 43
Maus4-MYCN	JoMa1-MYCN	Tag 50
Maus5-MYCN	JoMa1-MYCN	Tag 57
Maus6-MYCN	JoMa1-MYCN	Tag 64
Maus1-ALK	JoMa1-ALK ^{F1174L}	Tag 48
Maus2-ALK	JoMa1-ALK ^{F1174L}	Tag 48

Tab.4: Todeszeitpunkte der jeweiligen immundefizienten Nacktmäuse in Tagen nach Transplantation (Tx) von JoMa1-MYCN, bzw. JoMa1-ALK^{F1174L} Neuralleistenstammzellen.

Als nächste Frage galt es zu klären, ob sich die in den immundefizienten Nacktmäusen induzierten Tumoren von den transplantierten JoMa1-MYCN, bzw. den transplantierten JoMa1-ALK^{F1174L}, abgeleitet haben. Zur Klärung dieser Frage wurde untersucht, ob die experimentellen Tumoren eine für den Vektor pMSCVpuro-attR spezifische DNA Sequenz, *pgk*, enthielten. Dies war in allen sechs Maustumoren induziert durch JoMa1-MYCN und in beiden Maustumoren induziert durch JoMa1-ALK^{F1174L} der Fall (Abb.16). So konnte nachgewiesen werden, daß die Tumoren sich tatsächlich von den transplantierten JoMa1-MYCN, bzw. JoMa1-ALK^{F1174L} ableiteten. Dies lieferte somit einen wichtigen Hinweis auf die Tumorigenität *in vivo* sowohl von JoMa1-MYCN NLSZ, als auch von JoMa1-ALK^{F1174L} NLSZ.

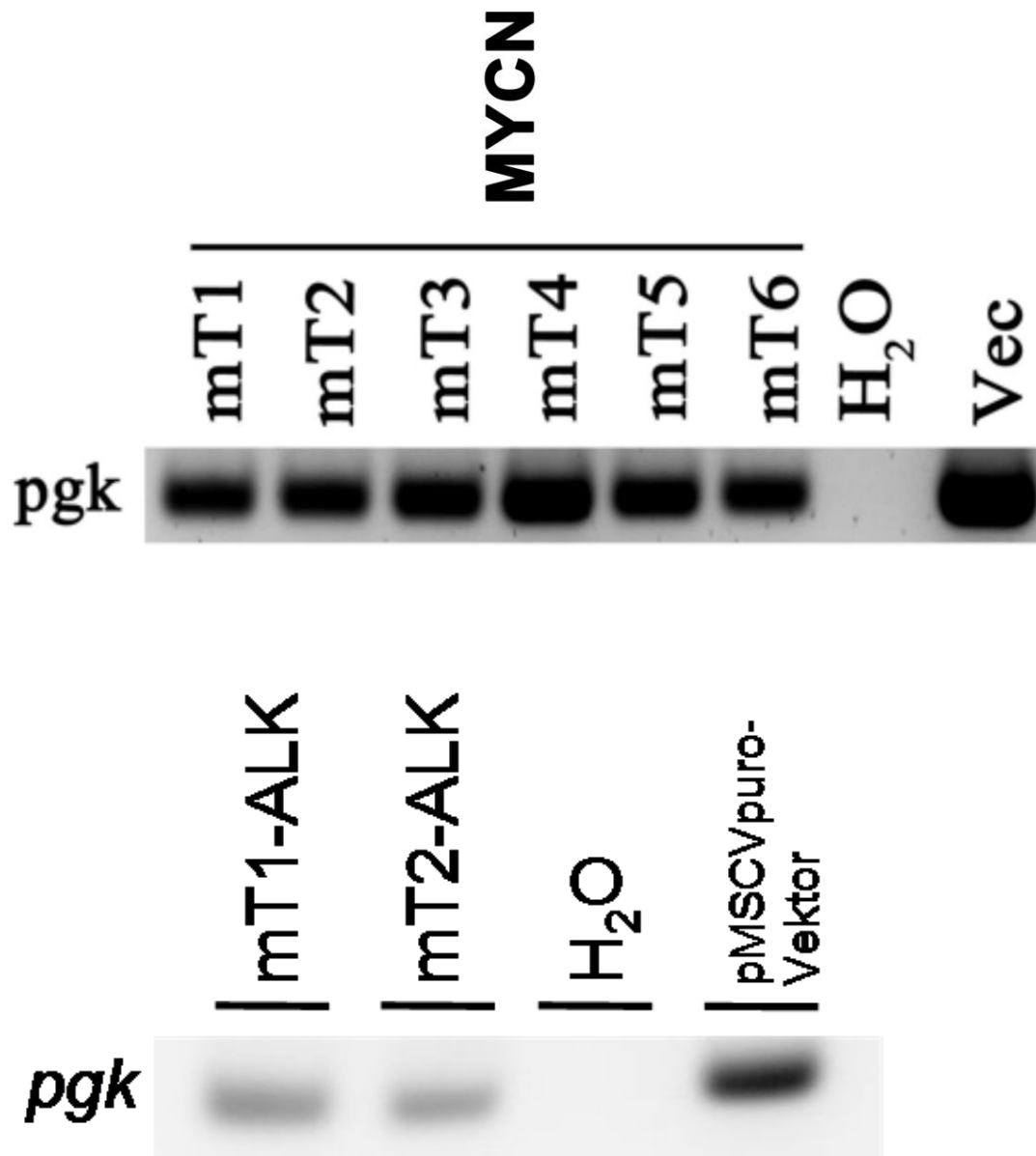


Abb.16: Tumorigenität von JoMa1-MYCN und JoMa1-ALK^{F1174L} *in vivo*. Die experimentellen Tumoren wiesen eine DNA Sequenz auf, *pgk*, die spezifisch für den Vektor pMSCVpuro-attR ist. Dies deutet darauf hin, daß die Tumoren sich tatsächlich von den transplantierten JoMa1-MYCN, bzw. JoMa1-ALK^{F1174L}, ableiten. Oben: Nachweis der stabilen Integration des Vektors pMSCVpuro-MYCN in die von JoMa1-MYCN abgeleiteten Tumoren mT1-MYCN bis mT6-MYCN mittels PCR. Unten: Nachweis der stabilen Integration des Vektors pMSCV-puro-ALK^{F1174L} in die Tumoren mT1-ALK und mT2-ALK abgeleitet von JoMa1-ALK^{F1174L} mittels PCR.

3.3.2. Histopathologie der Tumoren abgeleitet von JoMa1-MYCN

Aufgrund der Tatsache, daß sich in allen sechs immundefizienten Nacktmäusen, denen JoMa1-MYCN transplantiert wurden, Tumoren formierten, wurde im Folgenden auf diese Tumoren ein besonderes Augenmerk gelegt. Nachdem die Nacktmäuse aufgrund der Größe ihrer Tumoren (Abbruchkriterium = 1500 mm³) per zervikaler Dislokation getötet werden mußten, wurden die Tumoren entnommen, mittels Formalin fixiert, dehydriert, mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt, in Paraffin gebettet und am Mikrotom geschnitten. Sie wurden in der Folge einer histopathologischen Untersuchung zugeführt. Die Tumoren ähnelten keineswegs Sarkomen, sondern es gab deutliche Ähnlichkeiten zwischen den durch JoMa1-MYCN induzierten Tumoren und humanen Neuroblastomen. Es handelte sich um Tumoren bestehend aus kleinen blauen runden Zellen mit eingestreuten Homer-Wright Pseudorosetten. Außerdem enthielten die Tumoren mit Neuropil eine für humane Neuroblastome sehr charakteristische Struktur (Abb.17).

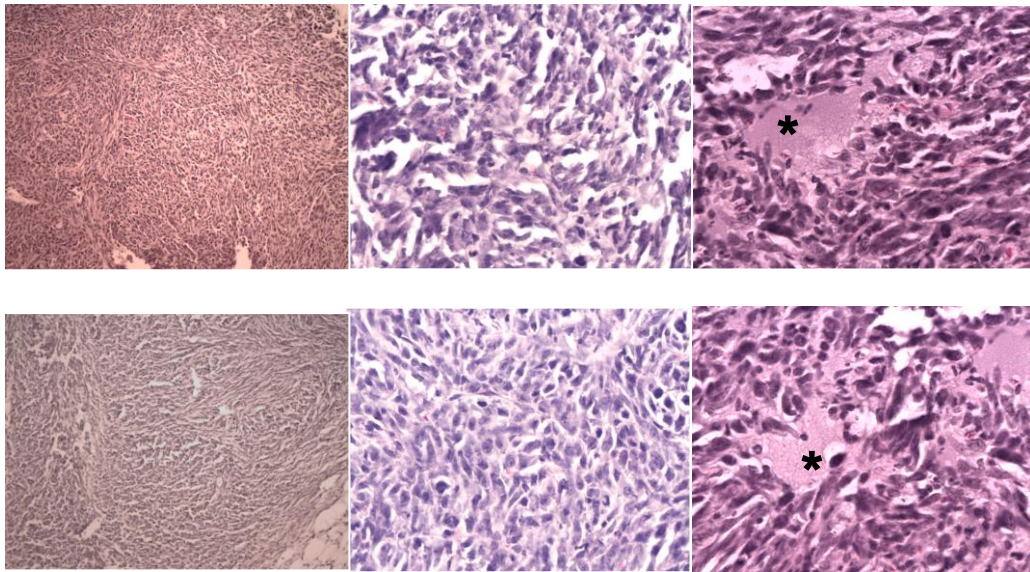


Abb.17: Durch JoMa1-MYCN induzierte Tumoren. Histologisch weisen die Tumoren hohe Ähnlichkeiten zu humanen Neuroblastomen auf: Es finden sich Homer-Wright Pseudorosetten als ein typisches Merkmal humaner Neuroblastome und die mit * markierten Stellen zeigen Neuropil. Obere Reihe von links nach rechts: Maustumor1-MYCN in 10facher Vergrößerung, Maustumor1-MYCN in 40facher Vergrößerung, Maustumor1-MYCN in 40facher Vergrößerung mit Neuropil (*). Untere Reihe von links nach rechts: Maustumor2-MYCN in 10facher Vergrößerung, Maustumor2-MYCN in 40facher Vergrößerung mit Homer-Wright Pseudorosette, Maustumor2-MYCN in 40facher Vergrößerung mit Neuropil (*).

3.3.3. Expression von MYCN und ALK^{F1174L} in den experimentellen Tumoren

Nachdem nachgewiesen werden konnte, daß JoMa1-MYCN und JoMa1-ALK^{F1174L} durch ihre stabile Überexpression von MYCN, bzw. von ALK^{F1174L}, *in vivo* tumorigen sind, stellte sich die Frage, ob es einen Zusammenhang zwischen dem Zeitpunkt der jeweiligen Tumorbildung und der Höhe der Expression von MYCN, bzw. von ALK^{F1174L}, auf mRNA Ebene gibt. Hierzu wurde die Expression von MYCN, bzw. von ALK^{F1174L}, in den experimentellen Tumoren und den parenteralen JoMa1, JoMa1-MYCN oder JoMa1-ALK^{F1174L} Zelllinien durch quantitative Echtzeit-PCR verglichen. Interessanterweise zeigte sich, daß

die Expression von MYCN in den sich langsam entwickelnden Maustumoren mT1-MYCN und mT2-MYCN niedriger war im Vergleich zu den anderen Tumoren. Jedoch war die Expression von MYCN in mT1-MYCN und mT2-MYCN immer noch höher als in den parenteralen JoMa1 Zellen (Abb.18). Ein ähnlich inverses Verhalten der Expression von ALK^{F1174L} ließ sich bei den durch JoMa1- ALK^{F1174L} induzierten Tumoren zwar nicht nachweisen, dennoch zeigte sich eine deutlich höhere Expression von ALK^{F1174L} in den experimentellen Tumoren mT1-ALK und mT2-ALK, als in parenteralen JoMa1 und JoMa1- ALK^{F1174L} (Abb.19).

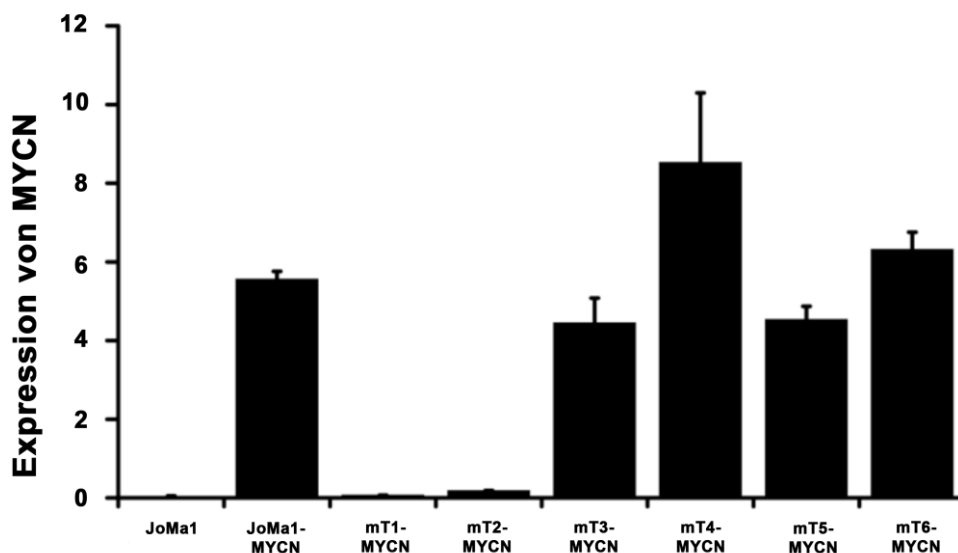


Abb.18: Quantitative Echtzeit-PCR: Experimentelle Tumoren, parenterale JoMa1 und JoMa1-MYCN Zelllinien im Vergleich. Die Expression von MYCN in den sich langsam entwickelnden Maustumoren mT1-MYCN und mT2-MYCN war niedriger im Vergleich zu den anderen Tumoren. Dennoch war die Expression von MYCN in mT1-MYCN und mT2-MYCN immer noch höher als in den parenteralen JoMa1 Zellen. Die Expressionswerte wurden auf GAPDH normalisiert und relativ zur Expressionshöhe in JoMa1-MYCN angegeben. Die Messung erfolgte mittels Biogazelle.

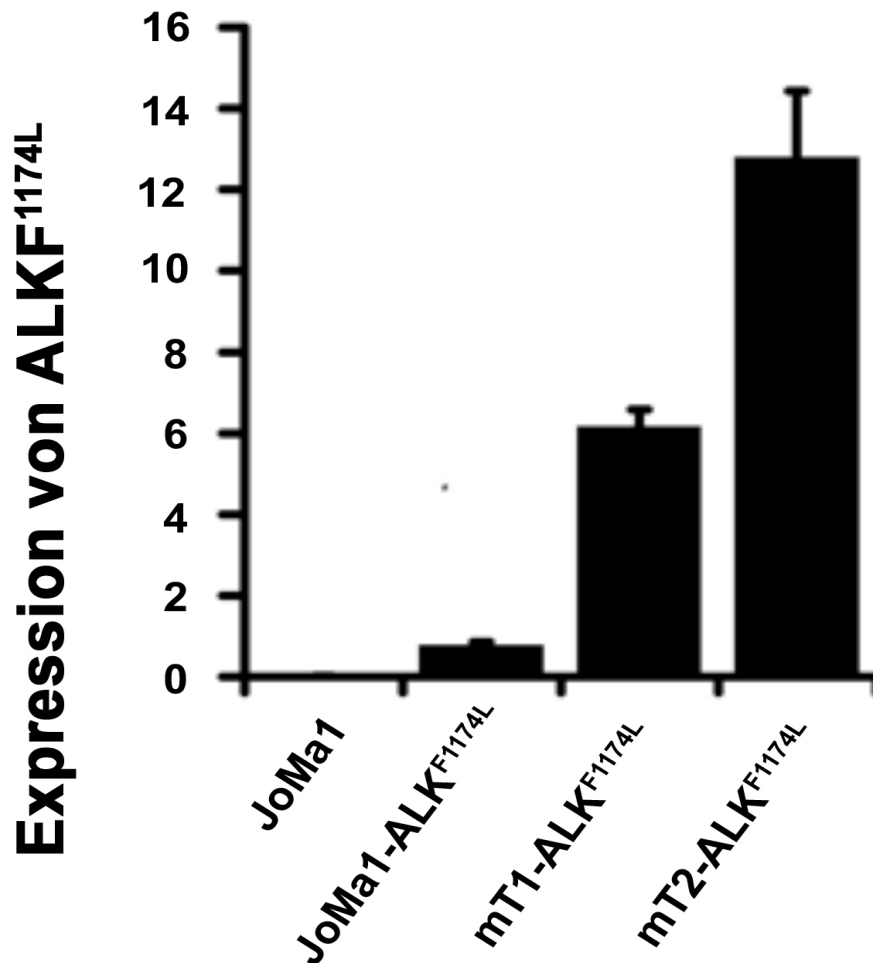


Abb.19: Quantitative Echtzeit-PCR: Experimentelle Tumoren, parenterale JoMa1 und die JoMa1-ALKF1174L Zelllinie im Vergleich. Die Expression von ALKF1174L in den experimentellen Tumoren lag deutlich über der in parenteralen JoMa1 und JoMa1-ALKF1174L Zellen. Die Expressionswerte wurden auf GAPDH normalisiert und relativ zur Expressionshöhe in JoMa1-ALKF1174L angegeben.

3.4. Etablierung von Neuroblastomzelllinien aus den induzierten Tumoren

Zur Untersuchung der längerfristigen Auswirkungen einer Überexpression von MYCN, bzw. von JoMa1-ALKF1174L, auf das Proliferationsverhalten und den Phänotyp von JoMa1 Neuralleistenstammzellen (NLSZ) sollten aus den induzierten Tumoren Zelllinien etabliert werden. Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob eine serielle Transplantation dieser Zellen abgeleitet von

den durch JoMa1-MYCN induzierten Tumoren zu einer beschleunigten Tumorformation in Nacktmäusen führen würde im Vergleich zu JoMa1-MYCN.

3.4.1. Etablierung der NB-Zelllinien JoMa1-MYCN-T1 bis JoMa1-MYCN-T6, sowie JoMa1-ALK^{F1174L}-T1 und JoMa1-ALK^{F1174L}-T2

Aus jedem der Tumoren, die sich nach Transplantation von JoMa1-MYCN, bzw. nach Transplantation von JoMa1-ALK^{F1174L}, in immundefiziente Nacktmäuse formiert haben, wurde eine Neuroblastomzelllinie (NB-Zelllinie) etabliert. Im Gegensatz zur Kultivierung der parenteralen JoMa1 NLSZ war die Kultivierung dieser neu etablierten murinen Neuroblastomzelllinien unabhängig von bestimmten Wachstumsfaktoren möglich, beispielsweise wurde kein Hühnerembryonenextrakt als Zusatz zum Medium benötigt. Die NB-Zelllinie bekam jeweils den Namen des Tumors, aus dem sie isoliert wurde. So wurde die NB-Zelllinie JoMa1-MYCN-T1 aus Maustumor1-MYCN isoliert, die NB-Zelllinie JoMa1-MYCN-T2 aus Maustumor2-MYCN et cetera bis zur NB-Zelllinie JoMa1-MYCN-T6 isoliert aus Maustumor6-MYCN, bzw. die NB-Zelllinie JoMa1-ALK^{F1174L}-T1 und JoMa1-ALK^{F1174L}-T2 (Tab.5). Die etablierten murinen NB-Zelllinien ähnelten in ihrem Phänotyp NB-Zelllinien abgeleitet von primären humanen Neuroblastomen. So wiesen JoMa1-MYCN-T1 bis JoMa1-MYCN-T6 morphologisch kleine runde Zellen auf (Abb.17).

Transplantierte NLSZ	Induzierter Maustumor	Etablierte NB-Zelllinie
JoMa1-MYCN	mT1-MYCN	JoMa1-MYCN-T1
JoMa1-MYCN	mT2-MYCN	JoMa1-MYCN-T2
JoMa1-MYCN	mT3-MYCN	JoMa1-MYCN-T3
JoMa1-MYCN	mT4-MYCN	JoMa1-MYCN-T4
JoMa1-MYCN	mT5-MYCN	JoMa1-MYCN-T5
JoMa1-MYCN	mT6-MYCN	JoMa1-MYCN-T6
JoMa1-ALK ^{F1174L}	mT1-ALK ^{F1174L}	JoMa1-ALK ^{F1174L} -T1
JoMa1-ALK ^{F1174L}	mT2-ALK ^{F1174L}	JoMa1-ALK ^{F1174L} -T2

Tab.5: Zuordnung der induzierten Maustumoren zu den jeweils transplantierten Neuralleistenstammzellen (NLSZ) und Zuordnung der etablierten Neuroblastomzelllinien (NB-Zelllinien) zu den jeweils induzierten Maustumoren.

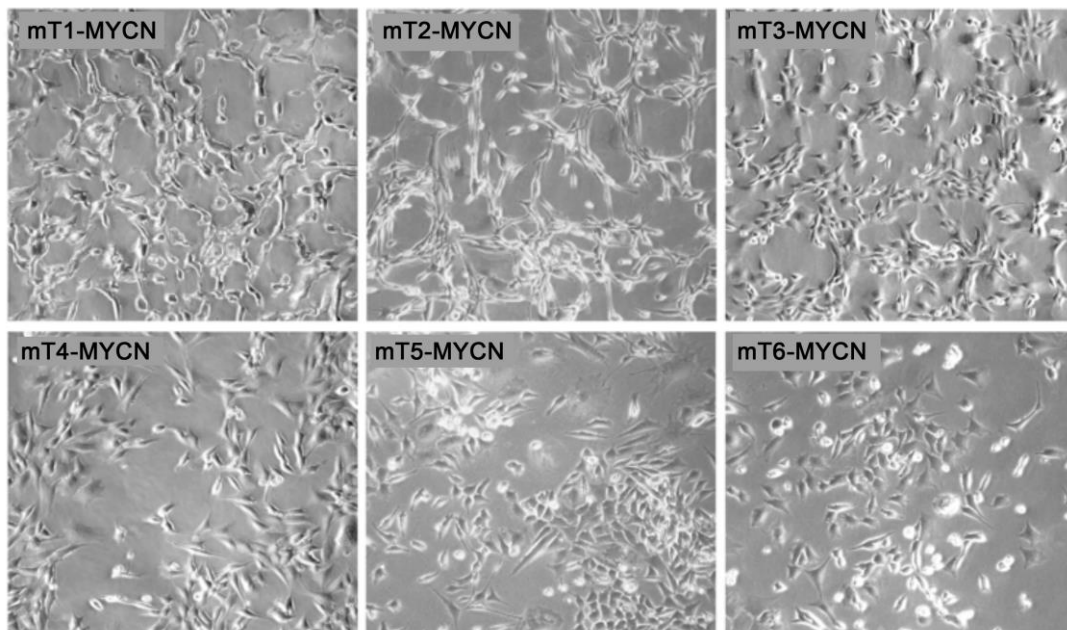


Abb.20: NB-Zelllinien isoliert aus den durch JoMa1-MYCN induzierten experimentellen Maustumoren ähneln in ihrem Phänotyp NB-Zelllinien, die aus primären humanen Neuroblastomen isoliert wurden. Je 100 fache Vergrößerung.

3.4.2. Zunahme der Tumorigenität bei serieller Transplantation von JoMa1-MYCN und JoMa1-ALK^{F1174L}

Nachdem mit MYCN und mit ALK^{F1174L} transfizierte JoMa1 NLSZ *in vivo* Tumoren induziert haben, sollte in einem weiteren Schritt geklärt werden, ob es bei serieller Transplantation der Neuroblastomzelllinien, etabliert aus diesen primären experimentellen Tumoren, zu einer Zunahme der Tumorigenität kommen würde. Um diese Frage zu überprüfen, wurden je 3 x 10⁷ JoMa1-MYCN-T1 bis JoMa1-MYCN-T4 (vergleiche Tab.5 und Tab.6a+6b) in insgesamt zwanzig immundefiziente Nacktmäuse retransplantiert. Auch wurde die gleiche Anzahl an JoMa1-ALK^{F1174L}-T1, bzw. JoMa1-ALK^{F1174L}-T2, in jeweils fünf weitere immundefiziente Nacktmäuse retransplantiert. In allen dreißig Mäusen, die in das Experiment eingeschlossen wurden, kam es zu einer Induktion von Tumoren.

Es kann von einer Zunahme der Tumorigenität der JoMa1-MYCN, sowie der JoMa1-ALK^{F1174L} gesprochen werden, da es sowohl zu einer Reduktion der Zeit bis zu einer Tumormanifestation (Abb.21; Tab.6a+6b), als auch zu einer Verstärkung des Tumorwachstums kam (Abb.22). Interessanterweise kam es auch bei den Zelllinien, die sich aus den initial spät manifestierten Tumoren mT1-MYCN und mT2-MYCN ableiteten, zu einem verstärkten Tumorwachstum und zu einer Reduktion der Zeit bis zu einer Tumormanifestation (Abb. 21). Die durch serielle Transplantation induzierten Tumoren wurden in Anlehnung an die primären experimentellen Tumoren jeweils mit dem Suffix „1“ bezeichnet. Beispielsweise wurde aus dem Tumor mT1-MYCN die Zelllinie JoMa1-MYCN-T1 isoliert, der im Folgenden nach Retransplantation von Zellen dieser Zelllinie induzierte Tumor wurde mT1.1-MYCN genannt (Tab.7).

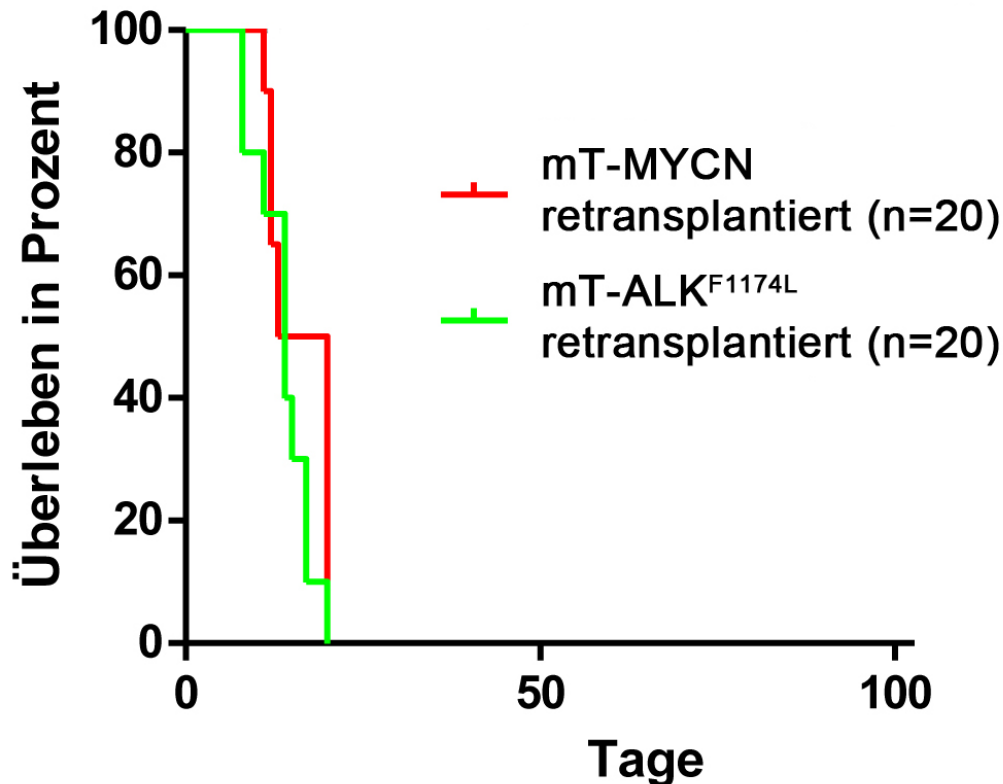


Abb.21: Zunahme der Tumorigenität bei serieller Transplantation von NB-Zelllinien abgeleitet von JoMa1-MYCN und JoMa1-ALK^{F1174L}. Es kam zu einer deutlichen Reduktion der Zeit bis zu einer Tumorformation. Mäuse, denen Zellen der NB-Zelllinien abgeleitet von den Tumoren induziert durch JoMa1-MYCN retransplantiert wurden, JoMa1-MYCN-T1 bis JoMa1-MYCN-T4 (vergleiche Tab.5), mußten an den Tagen 11, 12, 13 und 20 nach Retransplantation aufgrund der Tumorgroße getötet werden (rote Linie). Im Vergleich dazu überlebten die Mäuse nach Transplantation (Tx) von JoMa1-MYCN 43, 50, 57, 64, 106 und 123 Tage (siehe Abb. 15). Mäuse, denen Zelllinien abgeleitet von den Tumoren induziert durch JoMa1-ALK^{F1174L} retransplantiert wurden, JoMa1-ALK^{F1174L}-T1 und JoMa1-ALK^{F1174L}-T2 (vergleiche Tab.5), lebten 8, 11, 14, 15, 17 und 20 Tage nach Retransplantation (grüne Linie). Im Vergleich überlebten beide Mäuse, die nach Tx von JoMa1-ALK^{F1174L} Tumore entwickelten, 48 Tage (siehe Abb. 15).

Bezeichnung Maus	Retransplantierte NB-Zelllinie	Todeszeitpunkt nach Retransplantation
Maus1-MYCN-ReTx	JoMa1-MYCN-T1	Tag 12
Maus2-MYCN-ReTx	JoMa1-MYCN-T1	Tag 12
Maus3-MYCN-ReTx	JoMa1-MYCN-T1	Tag 12
Maus4-MYCN-ReTx	JoMa1-MYCN-T1	Tag 12
Maus5-MYCN-ReTx	JoMa1-MYCN-T1	Tag 13
Maus6-MYCN-ReTx	JoMa1-MYCN-T2	Tag 11
Maus7-MYCN-ReTx	JoMa1-MYCN-T2	Tag 11
Maus8-MYCN-ReTx	JoMa1-MYCN-T2	Tag 12
Maus9-MYCN-ReTx	JoMa1-MYCN-T2	Tag 13
Maus10-MYCN-ReTx	JoMa1-MYCN-T2	Tag 13
Maus11-MYCN-ReTx	JoMa1-MYCN-T3	Tag 20
Maus12-MYCN-ReTx	JoMa1-MYCN-T3	Tag 20
Maus13-MYCN-ReTx	JoMa1-MYCN-T3	Tag 20
Maus14-MYCN-ReTx	JoMa1-MYCN-T3	Tag 20
Maus15-MYCN-ReTx	JoMa1-MYCN-T3	Tag 20
Maus16-MYCN-ReTx	JoMa1-MYCN-T4	Tag 20
Maus17-MYCN-ReTx	JoMa1-MYCN-T4	Tag 20
Maus18-MYCN-ReTx	JoMa1-MYCN-T4	Tag 20
Maus19-MYCN-ReTx	JoMa1-MYCN-T4	Tag 20
Maus20-MYCN-ReTx	JoMa1-MYCN-T4	Tag 20

Tab.6a: Todeszeitpunkte der jeweiligen immundefizienten Nacktmäuse in Tagen nach Retransplantation (ReTx) von JoMa1-MYCN-T1 bis JoMa1-MYCN-T4.

Bezeichnung Maus	Retransplantierte NB-Zelllinie	Todeszeitpunkt nach ReTx
Maus1-ALK ^{F1174L} -ReTx	JoMa1-ALK ^{F1174L} -T1	Tag 8
Maus2-ALK ^{F1174L} -ReTx	JoMa1-ALK ^{F1174L} -T1	Tag 8
Maus3-ALK ^{F1174L} -ReTx	JoMa1-ALK ^{F1174L} -T1	Tag 11
Maus4-ALK ^{F1174L} -ReTx	JoMa1-ALK ^{F1174L} -T1	Tag 15
Maus5-ALK ^{F1174L} -ReTx	JoMa1-ALK ^{F1174L} -T1	Tag 20
Maus6-ALK ^{F1174L} -ReTx	JoMa1-ALK ^{F1174L} -T2	Tag 14
Maus7-ALK ^{F1174L} -ReTx	JoMa1-ALK ^{F1174L} -T2	Tag 14

Tab.6b: Todeszeitpunkte der jeweiligen immundefizienten Nacktmäuse in Tagen nach Retransplantation (ReTx) von JoMa1-ALK^{F1174L}-T1 und JoMa1-ALK^{F1174L}-T2.

Maustumor nach 1° Transplantation	Isolierte NB- Zelllinie	Maustumor nach Retransplantation
mT1-NMYC	JoMa1-MYCN-T1	mT1.1-NMYC
mT2-NMYC	JoMa1-MYCN-T2	mT2.1-NMYC
mT3-NMYC	JoMa1-MYCN-T3	mT3.1-NMYC
mT4-NMYC	JoMa1-MYCN-T4	mT4.1-NMYC
mT1-ALK[F1174L]	JoMa1-ALK[F1174L]	mT1.1-ALK[F1174L]
mT2-ALK[F1174L]	JoMa1-ALK[F1174L]	mT2.1-ALK[F1174L]

Tab.7: Zuordnung der etablierten Neuroblastomzelllinien (NB-Zelllinien) zu den jeweiligen primären (1°) Maustumoren aus denen sie isoliert wurden, sowie Zuordnung der durch serielle Transplantation induzierten Tumoren zu den jeweils retransplantierten NB-Zelllinien.

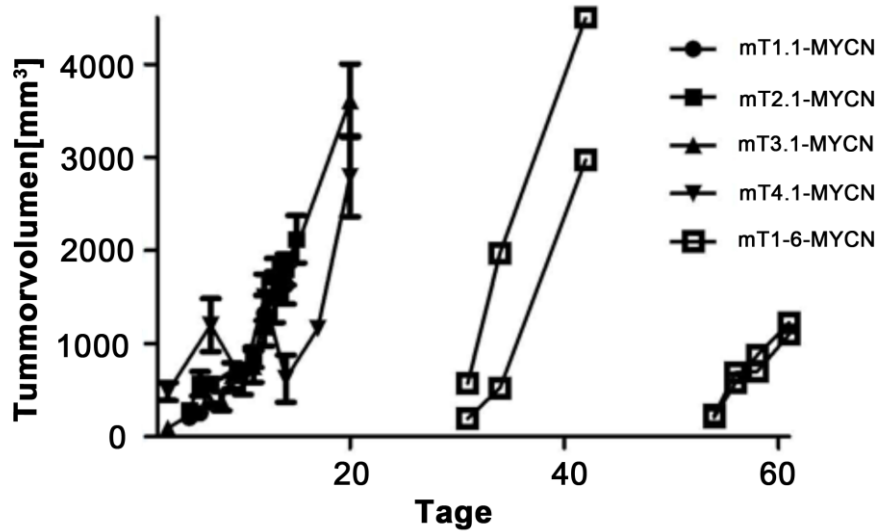


Abb.22: Retransplantierte Tumoren abgeleitet von NB-Zelllinien, isoliert aus den durch JoMa1-MYCN induzierten Tumoren, zeigen ein verstärktes Tumorwachstum im Vergleich zu Tumoren primär abgeleitet von JoMa1-MYCN. mT1.1-MYCN, mT1.2-MYCN, mT3.1-MYCN und mT4.1-MYCN bezeichnen Tumoren induziert nach serieller Transplantation, bei mT1-6-MYCN handelt es sich um die primär induzierten Tumoren (vergleiche Tab.7).

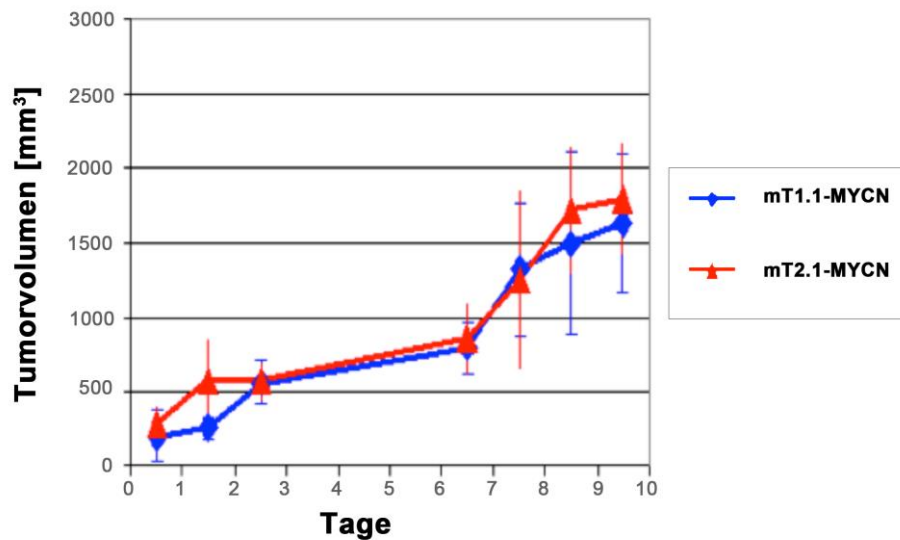


Abb.23: Erhöhte Tumorigenität von JoMa1-MYCN nach serieller Transplantation. Auch bei den NB-Zelllinien, die sich von den initial spät manifestierten Tumoren mT1-MYCN und mT2-MYCN ableiteten, kam es zu einer Reduktion der Zeit bis zu einer Tumormanifestation sowie zu einem verstärkten Tumorwachstum.

3.5. Proliferation der Neuroblastomzelllinien JoMa1-MYCN-T1 und JoMa1-MYCN-T2 in Abhängigkeit von N-Myc

Während ursprüngliche JoMa1 Neuralleistenstammzellen neben einem speziellen Neuralleistenstammzellmedium mit Hühnerembryonenextrakt (HEE) und bestimmten Wachstumsfaktoren als Zusatz auch noch Tamoxifen benötigen, um nicht in den Zelltod überzugehen, konnten mit MYCN und mit ALK^{F1174L} transfizierte JoMa1 zwar ohne Tamoxifen proliferieren, also ohne niedrige Expression von konditional aktivem c-Myc, jedoch benötigten sie auch HEE und die Wachstumsfaktoren als Zusatz zu ihrem Medium. Im Gegensatz dazu war das Wachstum der etablierten Neuroblastomzelllinien (NB-Zelllinien) JoMa1-MYCN-T1 bis JoMa1-MYCN-T6, sowie JoMa1-ALK^{F1174L}-T1 und JoMa1-ALK^{F1174L}-T2 unter für NB-Zelllinien ganz gewöhnlichen Kulturbedingungen und unabhängig von jeglichen Wachstumsfaktoren neben fetalem Kälberserum kultivierbar. Sowohl MYCN, als auch ALK^{F1174L} haben somit JoMa1 NLSZ immortalisiert. Im Folgenden stellte sich die Frage, ob das Wachstum der aus den durch N-Myc induzierten experimentellen Tumoren etablierten Neuroblastomzelllinien auch nach wie vor durch N-Myc angetrieben wird oder ob der maligne Phänotyp der Tumorzellen im Verlauf der Tumorentwicklung und der Tumorprogression eventuell vom initiiierenden Onkogen MYCN unabhängig geworden ist. Um diese Frage zu beantworten, wurde exemplarisch an den beiden NB-Zelllinien JoMa1-MYCN-T1 und JoMa1-MYCN-T2 untersucht, wie sich eine Behandlung der Zellen mit NBT-272, hierbei handelt es sich um einen kleinen molekularen Inhibitor von Proteinen der MYC-Familie (von Bueren et al. 2007), auf deren Proliferation auswirken würde.

Tatsächlich zeigte sich, dass NBT-272 bereits in nanomolaren Konzentrationen die Proliferation und Viabilität von JoMa1-MYCN-T1 und JoMa1-MYCN-T2 deutlich reduzierte (Abb.24).

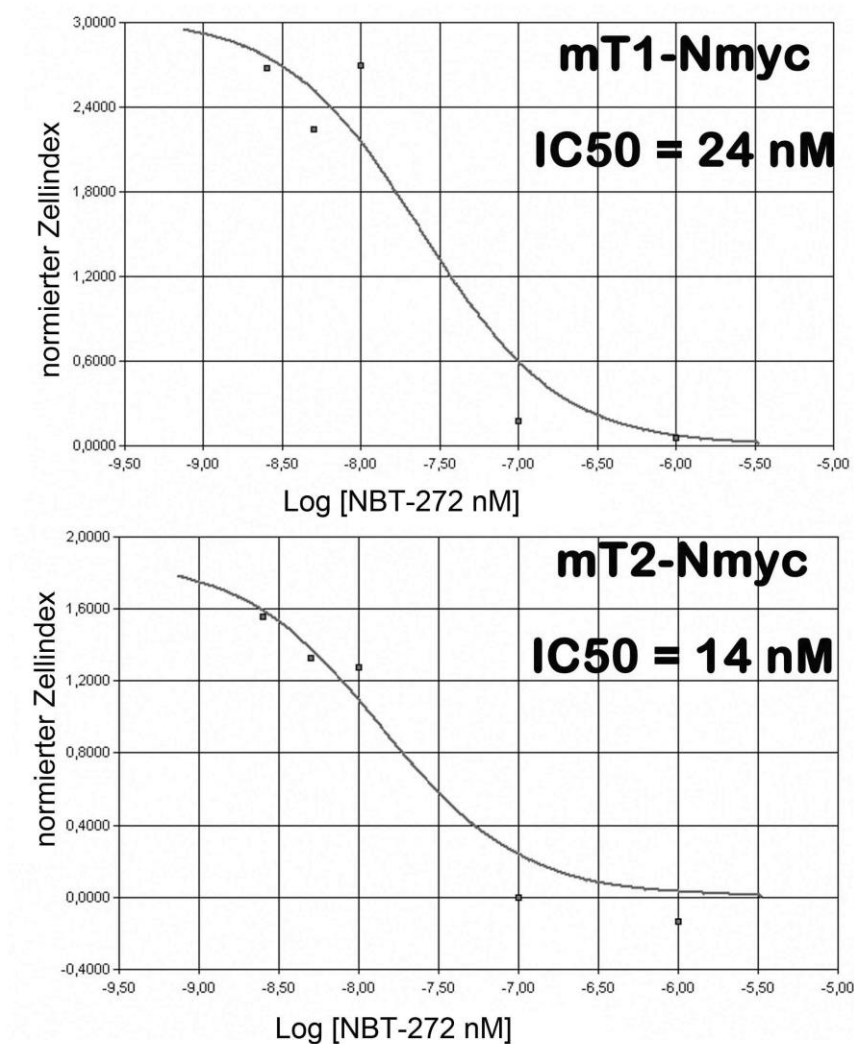


Abb.24: Abhängigkeit des Wachstums der Neuroblastomzelllinien mT1-NMYC und mT2-NMYC von N-Myc. Als Antwort auf die Zufuhr von NBT-272, ein kleiner molekularer Inhibitor von Proteinen der MYC-Familie, gingen die Zellen in den Zelltod über. Dies ist ein wichtiger Hinweis darauf, daß die Tumorzellen noch immer auf die Präsenz des initilierenden Onkogens MYCN angewiesen sind und darauf, daß N-Myc ein wichtiger Einflussfaktor auf die Tumorzellproliferation während der Tumorprogression bleibt. Die Impedanzmessung erfolgte mittels xCelligence Device (Roche).

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit untersuchte ich, ob Neuralleistenvorläuferzellen *in vivo* Neuroblastome induzieren können. Hierzu bediente ich mich des multipotenten JoMa1 Neuralleistestammzell-Modells, indem ich zunächst JoMa1 stabil mit EGFP, MYCN, sowie ALK^{F1174L} transfizierte. Die so entstandenen Derivate JoMa1-EGFP, JoMa1-MYCN und JoMa1-ALK^{F1174L} transplantierte ich in immuninkompetente Nacktmäuse, um sie auf ihre Tumorigenität *in vivo* untersuchen zu können. Im nächsten Schritt wurden aus den experimentell induzierten Tumoren murine Neuroblastom-Zelllinien etabliert und diese in der Folge seriell transplantiert. Zusätzlich wurde untersucht, wie sich eine Behandlung dieser murinen Neuroblastom-Zelllinien mit NBT-272, hierbei handelt es sich um einen kleinen molekularen Inhibitor von Proteinen der MYC-Familie (von Bueren et al. 2007), auf deren Proliferation auswirkt.

4.1. MYCN und ALK^{F1174L} sind Neuroblastom-induzierende Onkogene

Zunächst wurde untersucht, ob die beiden Onkogene MYCN und ALK^{F1174L}, die bekanntlich eine Rolle in der Pathogenese von humanen Neuroblastomen spielen (Brodeur 2003; Chen 2008; George 2008; Janoueix-Lerosey 2008; Mosse 2008), das Potential besitzen, murine Neuralleistestammzellen (NLSZ) zu immortalisieren. Während das Onkogen MYCN in circa 20% aller Neuroblastome amplifiziert (Brodeur 2003) ist, finden sich in allen familiären Fällen und in circa 8% aller sporadischen Neuroblastome aktivierende Mutationen des Onkogens ALK (Chen 2008; George 2008; Janoueix-Lerosey 2008; Mosse 2008), wobei die Mutation F1174L als die aggressivste Form beschrieben wird. Zur Untersuchung des Immortalisierungspotentials von MYCN

und ALK^{F1174L} wurde sich der JoMa1 Neuralleistenstammzelllinie bedient. Hierbei handelt es sich um eine Zelllinie, die ursprünglich zur Analyse der Entwicklung der Neuralleiste etabliert wurde (Maurer et al. 2007). Im Rahmen dieser Arbeit konnte zum einen gezeigt werden, daß Neuralleistenstammzellen Ursprungszellen des Neuroblastoms sind. Zum anderen konnte gezeigt werden, daß Stammzellen im Rahmen der Tumorentstehung - hier am Beispiel der Neuroblastomgenese untersucht- eine ganz zentrale Rolle spielen. Es wurden JoMa1 NLSZ mit cDNA transfiziert, die entweder EGFP, MYCN oder ALK^{F1174L} kodieren. Sowohl MYCN, als auch ALK^{F1174L} führte zu einer Immortalisierung und Transformation der JoMa1 NLSZ: Eine stabile Überexpression dieser beiden Onkogene konnte einen immortalisierten Phänotyp in murinen neuralleistenstammzellähnlichen Zellen induzieren. Ein wichtiger Hinweis auf die Spezifität dieses Zellkulturmodells dahingehend, daß es nur Gene detektiert, die tatsächlich im Rahmen der Neuroblastomgenese transformierend wirken, ist die Tatsache, daß ektoper Expression von Tyrosinkinase A (TrkA) zu keiner Transformation von JoMa1 führte (Schulte et al. 2013). TrkA ist eine Rezeptortyrosinkinase mit onkogenem Potential in Malignitäten wie beispielsweise Leukämien (Martin-Zanca et al. 1989). Bezogen auf das Neuroblastom ist TrkA mit einem günstigen Krankheitsverlauf und positiven biologischen Charakteristika verknüpft (Maris 2010).

4.2. Verwendung von JoMa1 Zellen zur Untersuchung der Tumorigenität *in vivo*

Neben dem hier etablierten Neuroblastom-Mausmodell stehen bereits verschiedene andere Modelle als Xenograft, sowie als transgene Modelle, zur Verfügung. Das am weitesten verbreitete Modell ist eine von Weiss et al.

entwickelte Mauslinie, bei der N-Myc unter der Kontrolle des Tyrosinhydroxylase-Promotors exprimiert wird und in welcher sich mit hoher Penetranz neuroblastomähnliche Tumoren bilden (Weiss et al. 1997). Obgleich dieses Modell bereits starke Hinweise dafür liefert, daß Neuroblastome aus Neuralleistenstammzellen entstehen, konnte hier die Neuroblastomgenese nicht einer klar definierten Zellpopulation zugeordnet werden. Hinzu kommt, daß die Expression des Tyrosinhydroxylase-Promotors nicht streng auf die Neuralleiste beschränkt ist. So bildeten konditional K-ras transgene Mäuse, welche mit Mäusen verpaart wurden, die Cre-Rekombinase unter dem Tyrosinhydroxylase-Promotor exprimierten, Hautwarzen und keine Neuroblastome (Schulte et al., unpublizierte Daten). Nachdem eine Überexpression der Onkogene MYCN oder ALK^{F1174L} *in vitro* zu einer Immortalisierung von JoMa1 NLSZ führte, wurde im nächsten Schritt untersucht, ob die immortalisierten Zellen JoMa1-MYCN und JoMa1- ALK^{F1174L} *in vivo* tumorigenes Potential besitzen. Zu diesem Zweck wurden parenterale JoMa1, JoMa1-EGFP, JoMa1-MYCN und JoMa1- ALK^{F1174L} subkutan in die Flanken von immundefizienten Nacktmäusen injiziert. Weder untransfizierte JoMa1, noch JoMa1-EGFP induzierten eine Tumorformation. Dahingegen induzierten JoMa1- ALK^{F1174L} in 2 von 6 Mäusen und JoMa1-MYCN in 6 von 6 Mäusen Tumoren. In ihrer Histopathologie ähnelten die experimentellen Tumoren humanen Neuroblastomen: Sie waren aus kleinen runden blauen Zellen mit eingestreuten Homer-Wright-Pseudorosetten aufgebaut (Abb.18). Dies liefert den Beweis dafür, dass Neuroblastome aus Neuralleistenstammzellen entstehen können. Es konnte zum ersten Mal in einem experimentellen Modell gezeigt werden, daß ALK^{F1174L} fähig ist, die

Neuroblastomgenese anzutreiben. Dieser Befund wurde später anhand transgener Modelle bestätigt (Heukamp et al. 2012). Wenn auch möglicherweise von einer gewissen Adaptation parenteraler JoMa1 an ein Leben *in vitro*, bis hin zu einer möglichen Prätransformation, ausgegangen werden kann, so haben sich diese Zellen *in vivo* dennoch als nicht tumorigen erwiesen. Eine Möglichkeit der Differenzierung zwischen c-MYC und N-Myc im Hinblick auf ihr tumorigenes Potential *in vivo* wäre gewesen, die Mäuse, denen untransfizierte JoMa1 transplantiert worden sind, mit 4-OHT zu behandeln, um die Wirkung von c-MYC *in vivo* untersuchen zu können. Dies war allerdings keine zentrale Frage dieser Arbeit, da in humanen Neuroblastomen die Amplifikation des MYCN Onkogens die funktionell relevante Aberration ist.

Obwohl im Verlauf dieser Arbeit eindeutig demonstriert werden konnte, daß eine Überexpression von MYCN und ALK^{F1174L} in NLSZ die Entwicklung von Neuroblastomen initiiert, kann die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, daß die NLSZ noch weitere Differenzierungsschritte durchlaufen, bevor sie vollkommen transformiert sind. Die Frage, ob diese auslösenden Ereignisse auch zu einem späteren Zeitpunkt der sympathoadrenergen Differenzierung zu einer Induktion von Neuroblastomen führen, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht beantwortet werden. Nichtsdestotrotz konnte gezeigt werden, daß die auslösenden Ereignisse bereits in NLSZ auftreten und sich Neuroblastome dann als maligne Abkömmlinge / Tochterprodukte von NLSZ entwickeln können.

4.3. Die serielle Transplantation von Tumoren weist auf die Bedeutung sekundärer Veränderungen hin

Aus allen experimentellen Tumoren ließen sich murine Neuroblastom-Zelllinien

(NB-Zelllinien) etablieren. Diese Tumorzelllinien zeigten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine erhöhte Aggressivität im Vergleich zu den im ersten Teil dieser Arbeit etablierten JoMa1-MYCN und JoMa1-ALK^{F1174L}. So wuchsen die neu isolierten Tumorzelllinien *in vitro* unabhängig von den zur Kultivierung der parenteralen Zellen notwendigen Wachstumsfaktoren. Phänotypisch erinnerten die Zelllinien JoMa1-MYCN-T1 bis JoMa1-MYCN-T6 an NB-Zelllinien, die von primären humanen Neuroblastomen abgeleitet wurden (Abb.19). Es kann von einer Zunahme der Tumorigenität der JoMa1-MYCN, sowie der JoMa1-ALK^{F1174L} *in vivo* gesprochen werden, da es sowohl zu einer Reduktion der Zeit bis zu einer Tumormanifestation (Abb.20; Tab.6), als auch zu einer Verstärkung des Tumorstwachstums kam (Abb.21). Interessanterweise kam es auch bei den NB-Zelllinien, die sich aus den initial spät manifestierten Tumoren mT1-NMYC und mT2-NMYC ableiteten, zu einem verstärkten Tumorstwachstum und zu einer Reduktion der Zeit bis zur Tumormanifestation (Abb. 22). Diese Beschleunigung der Tumorbildung im Verlauf der Retransplantationsversuche deutet auf zusätzliche Ereignisse im Zuge der Tumorgenese hin. Expressionsprofile der experimentellen Tumoren wiesen darauf hin, daß zumindest ein teilweiser Wandel in den Genexpressionsmustern der Tumorzellen stattgefunden hat während des Prozesses der Tumorentwicklung und Tumorstprogression (Schramm und Schulte 2012). Diese Alterationen der Genexpressionsmuster konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht werden, verdienen aber nähere Aufmerksamkeit und weitere Erforschung, sowohl auf genomischer, als auch auf transkriptomischer Ebene.

4.4. Das Wachstum der transformierten NB-Zellen ist abhängig von transformierenden Onkogenen

Hingegen konnte aufgezeigt werden, daß das Wachstum der NB-Zelllinien, etabliert aus den durch MYCN induzierten experimentellen Tumoren, nachwievor durch N-Myc angetrieben wird, daß also der maligne Phänotyp der Tumorzellen auch im Verlauf der Tumorentwicklung und der Tumorprogression nicht vom initiiierenden Onkogen MYCN unabhängig geworden ist. Es wurde exemplarisch an den beiden NB-Zelllinien JoMa1-MYCN-T1 und JoMa1-MYCN-T2 untersucht, wie sich eine Behandlung der Zellen mit NBT-727, hierbei handelt es sich um einen kleinen molekularen Inhibitor von Proteinen der MYC-Familie (von Bueren 2007), auf deren Proliferation auswirken würde. Es zeigte sich, daß NBT-272 bereits in nanomolaren Konzentrationen die Proliferation und Viabilität von JoMa1-MYCN-T1 und JoMa1-MYCN-T2 deutlich reduzierte. Dies ist ein wichtiger Hinweis darauf, daß die Tumorzellen noch immer auf die funktionale Präsenz des initiiierenden Onkogens MYCN angewiesen sind und darauf, daß MYCN ein wichtiger Einflußfaktor auf die Tumorzellproliferation während der Tumorprogression bleibt (Abb.22). Dies stimmt überein mit jüngeren Daten erzielt mit Hilfe eines durch MYCN angetriebenen murinen Medulloblastom-Modells (Swartling 2010) und mit durch c-Myc angetrieben Lymphomen (Soucek 2008). In beiden Modellen konnte eine Abhängigkeit von funktionellen MYC-Signalwegen aufgezeigt werden. Die therapeutische Relevanz von Onkogen-Addiktion begründet sich durch die Aussicht auf inhibitorische Therapie von MYCN als Perspektive für die moderne Therapie bei Neuroblastomen.

4.5. Verwendung des JoMa1 System zur schnellen Testung potentieller Neuroblastom-induzierender Onkogene

Neben der Erbringung des Beweises, daß Neuroblastome aus Neuralleistenstammzellen entstehen können, wurde im Rahmen dieser Arbeit das erste System etabliert, das es ermöglicht, schnell die der Neuroblastomgenese zu Grunde liegenden molekularen Alterationen zu analysieren, sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* und zwar gezielt in eben den Zellen, von denen angenommen wird, daß es die Ursprungszellen des Neuroblastoms sind. Ausgehend von diesem Modellsystem könnten durch den Einsatz von Pools verschiedener cDNAs oder shRNAs zur Transfektion der JoMa1 Zellen und anschließender Isolation der persistierenden cDNAs oder shRNAs aus den sich entwickelnden Neuroblastomen funktionelle genomische Screens durchgeführt werden, die eine effiziente Analyse der funktionellen Bedeutung von Genen in den bereits definierten chromosomalen Alterationen ermöglichen würden. Dies könnte außerdem dazu genutzt werden, die funktionelle Bedeutung von Genen, die erst noch im Zuge bevorstehender Genomsequenzierungsprojekte als mutiert identifiziert werden müssen, zu analysieren. Diese Strategie wurde vor einigen Jahren in einem Modell für hepatozelluläre Karzinome sehr erfolgreich eingeführt (Zender 2008). Mit Hilfe der sogenannten „Sequenzierung der nächsten Generation“ von 2011 („next generation sequencing“) ist es, im Gegensatz zur klassischen Sanger-Sequenzierung mit Kapillarelektrophorese (Sanger 1995), möglich, Millionen von DNA-Abschnitten auf einer kleinen Oberfläche zu binden und auslesen zu lassen. Diese Methode ermöglicht das direkte, schnelle und kosteneffektive Sequenzieren von DNA.

Die Differenzierung sog. „Driver Mutationen“ und „Passenger Mutationen“ des

Neuroblastoms könnte in Zukunft mit Hilfe des Testsystems JoMa1 durchgeführt werden. Es ist zu erwarten, daß im Rahmen der Genomsequenzierungsprojekte zahlreiche, bisher unbekannte, Mutationen in den Tumorgenomen der untersuchten Neuroblastome identifiziert werden. „Driver Mutationen“ sind essentiell für die maligne Transformation, „Passenger Mutationen“ hingegen sind funktionell nicht relevant. Von Interesse sind vor allen Dingen die „Driver Mutationen“, die pharmakologisch angreifbar sind, so daß gezielt an Signaltransduktionskaskaden angesetzt werden kann, die für transformierte Tumorzellen essentiell sind. Ein sehr bekanntes Beispiel für eine pharmakologisch angreifbare „Driver Mutation“ ist das durch eine Chromosomentranslokation der Chromosomen 9 und 22 entstehende BCR-ABL Fusionsprotein (Nowell 1960), welches bei 90 – 95 % der Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie vorhanden ist und durch den Antikörper Imatinib blockiert werden kann. Als weiteres Beispiel für das Produkt einer „Driver Mutation“ ist der mutierte oder amplifizierte EGF Rezeptor anzusehen, der in verschiedenen Tumorarten eine wichtige Rolle spielt und durch den Antikörper Gefitinib blockiert werden kann. Eine effektive Therapiestrategie zur pharmakologischen Blockade von Non-Kinase Onkogenen wie MYCN ist Gegenstand der aktuellen Forschung.

Zusammenfassend konnte anhand des JoMa1 Modellsystems gezeigt werden, daß Neuroblastome aus Neuralleistenstammzellen (NLSZ) entstehen können. Auch konnte gezeigt werden, daß JoMa1 NLSZ *in vitro* durch MYCN und ALK^{F1174L} immortalisiert werden können und daß JoMa1 NLSZ *in vivo* durch MYCN und ALK^{F1174L} Tumorigenität erlangen.

5. Zusammenfassung

Das Neuroblastom ist der häufigste solide extrakranielle Tumor des Kindesalters und weist eine große klinische Heterogenität auf. Amplifikationen des MYCN Onkogens finden sich in 20% aller Neuroblastome und korrelieren mit schlechter Prognose. Es wird diskutiert, dass sich Neuroblastome aus unreifen Neuralleistenstammzellen entwickeln. Um zu untersuchen, ob sich Neuroblastome tatsächlich aus Neuralleistenstammzellen entwickeln, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Neuralleistenstammzelllinie JoMa1 verwendet. JoMa1 Zellen wurden mit MYCN oder mit mutierten ALK^{F1174} , einem Onkogen, welches in ca. 10% aller Neuroblastome mutiert ist, transfiziert. Beide Onkogene immortalisierten JoMa1 Zellen *in vitro*. JoMa1-MYCN und JoMa1- ALK^{F1174L} Zellen, nicht aber JoMa1 Kontrollzellen, bildeten Tumore in Nacktmäusen, die humanen Neuroblastomen glichen. Die serielle Transplantation dieser Tumoren führte zu einer Beschleunigung der Tumorentwicklung. Eine Behandlung einer Zelllinie, die aus einem JoMa1-MYCN Tumor etabliert worden war, mit einem MYCN Inhibitor bestätigte, daß die Tumorzellen weiterhin abhängig von MYCN waren. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, daß sich Neuroblastome tatsächlich aus Neuralleistenstammzellen entwickeln. Es konnte darüber hinaus gezeigt werden, daß die Onkogene MYCN und ALK^{F1174L} tatsächlich das Potential haben, die Neuroblastomentstehung zu initiieren. Außerdem wurde mit dem JoMa1-Neuroblastommodell ein System zur Analyse der frühen Schritte der Neuroblastomentstehung und zur raschen Analyse des Neuroblastom-initierenden Potentials von Genen bzw. Genmutationen etabliert.

Literaturverzeichnis

1. Alberts B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter (2002). "Molecular Biology of the cell." 4 Garland Science, New York: p. 627.
2. Anderson, D. J. (1993). "Cell and molecular biology of neural crest cell lineage diversification." Curr Opin Neurobiol 3(1): 8-13.
3. Anderson, D. J., A. Groves, L. Lo, Q. Ma, M. Rao, N. M. Shah and L. Sommer (1997). "Cell lineage determination and the control of neuronal identity in the neural crest." Cold Spring Harb Symp Quant Biol 62: 493-504.
4. Attiyeh, E. F., W. B. London, Y. P. Mosse, Q. Wang, C. Winter, D. Khazi, P. W. McGrady, R. C. Seeger, A. T. Look, H. Shimada, G. M. Brodeur, S. L. Cohn, K. K. Matthay and J. M. Maris (2005). "Chromosome 1p and 11q deletions and outcome in neuroblastoma." N Engl J Med 353(21): 2243-53.
5. Baroffio, A., E. Dupin and N. M. Le Douarin (1988). "Clone-forming ability and differentiation potential of migratory neural crest cells." Proc Natl Acad Sci USA 85(14): 5325-9.
6. Beckwith, J. B., N. B. Kiviat and J. F. Bonadio (1990). "Nephrogenic rests, nephroblastomatosis, and the pathogenesis of Wilms' tumor." Pediatr Pathol 10(1-2): 1-36.
7. Beckwith, J. B. and E. V. Perrin (1963). "In Situ Neuroblastomas: A Contribution to the Natural History of Neural Crest Tumors." Am J Pathol 43: 1089-104.
8. Berthold, F., B. Hero, B. Kremens, R. Handgretinger, G. Henze, F. H. Schilling, M. Schrappe, T. Simon and C. Spix (2003). "Long-term results and risk profiles of patients in five consecutive trials (1979-1997) with stage 4 neuroblastoma over 1 year of age." Cancer Lett 197(1-2): 11-7.
9. Birren, S. J. and D. J. Anderson (1990). "A v-myc-immortalized sympathoadrenal progenitor cell line in which neuronal differentiation is initiated by FGF but not NGF." Neuron 4(2): 189-201.
10. Bixby, S., G. M. Kruger, J. T. Mosher, N. M. Joseph and S. J. Morrison (2002). "Cell-intrinsic differences between stem cells from different regions of the peripheral nervous system regulate the generation of neural diversity." Neuron 35(4): 643-56.
11. Bown, N., S. Cotterill, M. Lastowska, S. O'Neill, A. D. Pearson, D. Plantaz, M. Meddeb, G. Danglot, C. Brinkschmidt, H. Christiansen, G. Laureys, F. Speleman, J. Nicholson, A. Bernheim, D. R. Betts, J. Vandesompele and N. Van Roy (1999). "Gain of chromosome arm 17q and adverse outcome in patients with neuroblastoma." N Engl J Med 340(25): 1954-61.
12. Brodeur, G. M. (2003). "Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma." Nat Rev Cancer 3(3): 203-16.
13. Brodeur, G. M., J. M. Maris, D. J. Yamashiro, M. D. Hogarty and P. S. White (1997).
14. "Biology and genetics of human neuroblastomas." J Pediatr Hematol Oncol 19(2): 93-101.
15. Brodeur, G. M., A. Nakagawara, D. J. Yamashiro, N. Ikegaki, X. G. Liu, C. G. Azar, C. P. Lee and A. E. Evans (1997). "Expression of TrkA, TrkB and TrkC in human neuroblastomas." J Neurooncol 31(1-2): 49-55.

16. Brodeur, G. M., J. Pritchard, F. Berthold, N. L. Carlsen, V. Castel, R. P. Castleberry, B. De Bernardi, A. E. Evans, M. Favrot, F. Hedborg and et al. (1993). "Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment." J Clin Oncol **11**(8): 1466-77.
17. Brodeur, G. M., R. C. Seeger, A. Barrett, R. P. Castleberry, G. D'Angio, B. De Bernardi, A. E. Evans, M. Favrot, A. I. Freeman, G. Haase and et al. (1988). "International criteria for diagnosis, staging and response to treatment in patients with neuroblastoma." Prog Clin Biol Res **271**: 509-24.
18. Brodeur, G. M., R. C. Seeger, M. Schwab, H. E. Varmus and J. M. Bishop (1984). "Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage." Science **224**(4653): 1121-4.
19. Bronner-Fraser, M. and S. Fraser (1989). "Developmental potential of avian trunk neural crest cells in situ." Neuron **3**(6): 755-66.
20. Bronner-Fraser, M. and S. E. Fraser (1988). "Cell lineage analysis reveals multipotency of some avian neural crest cells." Nature **335**(6186): 161-4.
21. Bronner-Fraser, M. and S. E. Fraser (1991). "Cell lineage analysis of the avian neural crest." Development Suppl **2**: 17-22.
22. Bronner-Fraser, M., M. Sieber-Blum and A. M. Cohen (1980). "Clonal analysis of the avian neural crest: migration and maturation of mixed neural crest clones injected into host chicken embryos." J Comp Neurol **193**(2): 423-34.
23. Bronner-Fraser, M., C. D. Stern and S. Fraser (1991). "Analysis of neural crest cell lineage and migration." J Craniofac Genet Dev Biol **11**(4): 214-22.
24. Burkert, J., N. A. Wright and M. R. Alison (2006). "Stem cells and cancer: an intimate relationship." J Pathol **209**(3): 287-97.
25. Butrynski, J. E., D. R. D'Adamo, J. L. Hornick, P. Dal Cin, C. R. Antonescu, S. C. Jhanwar, M. Ladanyi, M. Capelletti, S. J. Rodig, N. Ramaiya, E. L. Kwak, J. W. Clark, K. D. Wilner, J. G. Christensen, P. A. Janne, R. G. Maki, G. D. Demetri and G. I. Shapiro (2010). "Crizotinib in ALK-rearranged inflammatory myofibroblastic tumor." N Engl J Med **363**(18): 1727-33.
26. Caron, H., P. van Sluis, J. de Kraker, J. Bokkerink, M. Egeler, G. Laureys, R. Slater, A. Westerveld, P. A. Voute and R. Versteeg (1996). "Allelic loss of chromosome 1p as a predictor of unfavorable outcome in patients with neuroblastoma." N Engl J Med **334**(4): 225-30.
27. Chen, S. and R. J. Lechleider (2004). "Transforming growth factor-beta-induced differentiation of smooth muscle from a neural crest stem cell line." Circ Res **94**(9): 1195-202.
28. Chen, Y., J. Takita, Y. L. Choi, M. Kato, M. Ohira, M. Sanada, L. Wang, M. Soda, A. Kikuchi, T. Igarashi, A. Nakagawara, Y. Hayashi, H. Mano and S. Ogawa (2008). "Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma." Nature **455**(7215): 971-4.
29. Cheung, NK. and MA. Dyer (2013). "Neuroblastoma: developmental biology, cancer genomics and immunotherapy." Nat Rev Cancer **13**(6): 397-411.

30. Chomczynski, P. and N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem **162**(1): 156-9.
31. Degoutin, J., N. Brunet-de, C. Cifuentes-Diaz and M. Vigny, M. (2009). "ALK (anaplastic lymphoma kinase) expression in DRG neurons and its involvement in neuron-Schwann cells interaction." Eur J Neurosci **29**: 275-286.
32. De Preter, K., J. Vandesompele, P. Heimann, N. Yigit, S. Beckman, A. Schramm, A. Eggert, R. L. Stallings, Y. Benoit, M. Renard, A. De Paepe, G. Laureys, S. Pahlman and F. Speleman (2006). "Human fetal neuroblast and neuroblastoma transcriptome analysis confirms neuroblast origin and highlights neuroblastoma candidate genes." Genome Biol **7**(9): R84.
33. Dorsky, R. I., R. T. Moon and D. W. Raible (2000). "Environmental signals and cell fate specification in premigratory neural crest." Bioessays **22**(8): 708-16.
34. Duff, R. S., C. J. Langtimm, M. K. Richardson and M. Sieber-Blum (1991). "In vitro clonal analysis of progenitor cell patterns in dorsal root and sympathetic ganglia of the quail embryo." Dev Biol **147**(2): 451-9.
35. Dupin, E., C. Real and N. Ledouarin. (2001). "The neural crest stem cells: control of neural crest cell fate and plasticity by endothelin-3." An Acad Bras Cienc **73**(4): 533-45.
36. Evans, A. E., G. J. D'Angio and J. Randolph (1971). "A proposed staging for children with neuroblastoma. Children's cancer study group A." Cancer **27**(2): 374-8.
37. Gadner, H., G. Gaedicke, C. Niemeyer und J. Ritter (2006). Pädiatrische Hämatologie und Onkologie, Springer Medizin Verlag.
38. George, R. E., T. Sanda, M. Hanna, S. Frohling, W. Luther, 2nd, J. Zhang, Y. Ahn, W. Zhou, W. B. London, P. McGrady, L. Xue, S. Zozulya, V. E. Gregor, T. R. Webb, N. S. Gray, D. G. Gilliland, L. Diller, H. Greulich, S. W. Morris, M. Meyerson and A. T. Look (2008). "Activating mutations in ALK provide a therapeutic target in neuroblastoma." Nature **455**(7215): 975-8.
39. Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.
40. Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-74.
41. Heukamp L. C., T. Thor, A. Schramm, K. De Preter, C. Kumps, B. De Wilde, A. Odersky, M. Peifer, S. Lindner, A. Spruessel, F. Pattyn, P. Mestdagh, B. Menten, S. Kuhfittig-Kulle, A. Künkele, K. König, L. Meder, S. Chatterjee, R. T. Ullrich, S. Schulte, J. Vandesompele, F. Speleman, R. Büttner, A. Eggert, J. H. Schulte (2012). "Targeted expression of mutated ALK induces neuroblastoma in transgenic mice." Sci Transl Med **4**(141): 141ra91.
42. Ito, K., T. Morita and M. Sieber-Blum (1993). "In vitro clonal analysis of mouse neural crest development." Dev Biol **157**(2): 517-25.
43. Ito, K. and M. Sieber-Blum (1993). "Pluripotent and developmentally restricted neural-crest-derived cells in posterior visceral arches." Dev Biol **156**(1): 191-200.

44. Iwahara, T., J. Fujimoto, D. Wen, R. Cupples, N. Bucay, T. Arakawa, S. Mori, B. Ratzkin, T. Yamamoto (1997). "Molecular characterization of ALK, a receptor tyrosine kinase expressed specifically in the nervous system." Oncogene **14**: 439–449.
45. Jager, R., J. Maurer, A. Jacob and H. Schorle (2004). "Cell type-specific conditional regulation of the c-myc proto-oncogene by combining Cre/loxP recombination and tamoxifen-mediated activation." Genesis **38**(3): 145-50.
46. Jain, M. K., M. D. Layne, M. Watanabe, M. T. Chin, M. W. Feinberg, N. E. Sibinga, C. M. Hsieh, S. F. Yet, D. L. Stemple and M. E. Lee (1998). "In vitro system for differentiating pluripotent neural crest cells into smooth muscle cells." J Biol Chem **273**(11): 5993-6.
47. Janoueix-Lerosey, I., D. Lequin, L. Brugieres, A. Ribeiro, L. de Pontual, V. Combaret, V. Raynal, A. Puisieux, G. Schleiermacher, G. Pierron, D. Valteau-Couanet, T. Frebourg, J. Michon, S. Lyonnet, J. Amiel and O. Delattre (2008). "Somatic and germline activating mutations of the ALK kinase receptor in neuroblastoma." Nature **455**(7215): 967-70.
48. Kim, J., L. Lo, E. Dormand and D. J. Anderson (2003). "SOX10 maintains multipotency and inhibits neuronal differentiation of neural crest stem cells." Neuron **38**(1): 17-31.
49. Kotewicz, M. L., J. M. D'Alessio, K. M. Driftmier, K. P. Blodgett and G. F. Gerard (1985). "Cloning and overexpression of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase in Escherichia coli." Gene **35**(3): 249-58.
50. Kotewicz, M. L., C. M. Sampson, J. M. D'Alessio and G. F. Gerard (1988). "Isolation of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase lacking ribonuclease H activity." Nucleic Acids Res **16**(1): 265-77.
51. Kruger, G. M., J. T. Mosher, S. Bixby, N. Joseph, T. Iwashita and S. J. Morrison (2002). "Neural crest stem cells persist in the adult gut but undergo changes in self-renewal, neuronal subtype potential, and factor responsiveness." Neuron **35**(4): 657-69.
52. Kwak, E. L., Y. J. Bang, D. R. Camidge, A. T. Shaw, B. Solomon, R. G. Maki, S. H. Ou, B. J. Dezube, P. A. Janne, D. B. Costa, M. Varella-Garcia, W. H. Kim, T. J. Lynch, P. Fidias, H. Stubbs, J. A. Engelman, L. V. Sequist, W. Tan, L. Gandhi, M. Mino-Kenudson, G. C. Wei, S. M. Shreeve, M. J. Ratain, J. Settleman, J. G. Christensen, D. A. Haber, K. Wilner, R. Salgia, G. I. Shapiro, J. W. Clark and A. J. Iafrate (2010). "Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer." N Engl J Med **363**(18): 1693-703.
53. Lastowska, M., C. Cullinane, S. Variend, S. Cotterill, N. Bown, S. O'Neill, K. Mazzocco, P. Roberts, J. Nicholson, C. Ellershaw, A. D. Pearson and M. S. Jackson (2001). "Comprehensive genetic and histopathologic study reveals three types of neuroblastoma tumors." J Clin Oncol **19**(12): 3080-90.
54. Lindl, T. (2000). Zell- und Gewebekultur.
55. Littlewood, T. D., D. C. Hancock, P. S. Danielian, M. G. Parker and G. I. Evan (1995). "A modified oestrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins." Nucleic Acids Res **23**(10): 1686-90.

56. Lo, L. and D. J. Anderson (1995). "Postmigratory neural crest cells expressing c-RET display restricted developmental and proliferative capacities." Neuron **15**(3): 527-39.
57. Lo, L. C., S. J. Birren and D. J. Anderson (1991). "V-myc immortalization of early rat neural crest cells yields a clonal cell line which generates both glial and adrenergic progenitor cells." Dev Biol **145**(1): 139-53.
58. Lo, L. C., S. J. Birren and D. J. Anderson (1991). "V-myc immortalization of early rat neural crest cells yields a clonal cell line which generates both glial and adrenergic progenitor cells." Dev Biol **145**(1): 139-53.
59. Look, A. T., F. A. Hayes, R. Nitschke, N. B. McWilliams and A. A. Green (1984). "Cellular DNA content as a predictor of response to chemotherapy in infants with unresectable neuroblastoma." N Engl J Med **311**(4): 231-5.
60. Look, A. T., F. A. Hayes, J. J. Shuster, E. C. Douglass, R. P. Castleberry, L. C. Bowman, E. I. Smith and G. M. Brodeur (1991). "Clinical relevance of tumor cell ploidy and N-myc gene amplification in childhood neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group study." J Clin Oncol **9**(4): 581-91.
61. Maris, J. M. (2010). "Recent advances in neuroblastoma." N Engl J Med **362**(23): 2202-11.
62. Maris, J. M., C. Guo, P. S. White, M. D. Hogarty, P. M. Thompson, D. O. Stram, R. Gerbing, K. K. Matthay, R. C. Seeger and G. M. Brodeur (2001). "Allelic deletion at chromosome bands 11q14-23 is common in neuroblastoma." Med Pediatr Oncol **36**(1): 24-7.
63. Maris, J. M. and K. K. Matthay (1999). "Molecular biology of neuroblastoma." J Clin Oncol **17**(7): 2264-79.
64. Maris, J. M., M. J. Weiss, Y. Mosse, G. Hii, C. Guo, P. S. White, M. D. Hogarty, T. Mirensky, G. M. Brodeur, T. R. Rebbeck, M. Urbanek and S. Shusterman (2002). "Evidence for a hereditary neuroblastoma predisposition locus at chromosome 16p12-13." Cancer Res **62**(22): 6651-8.
65. Maris, J. M., P. S. White, C. P. Beltinger, E. P. Sulman, R. P. Castleberry, J. J. Shuster, A. T. Look and G. M. Brodeur (1995). "Significance of chromosome 1p loss of heterozygosity in neuroblastoma." Cancer Res **55**(20): 4664-9.
66. Martin-Zanca, D., R. Oskam, G. Mitra, T. Copeland and M. Barbacid (1989). "Molecular and biochemical characterization of the human trk proto-oncogene." Mol Cell Biol **9**(1): 24-33.
67. Maurer, J., S. Fuchs, R. Jager, B. Kurz, L. Sommer and H. Schorle (2007). "Establishment and controlled differentiation of neural crest stem cell lines using conditional transgenesis." Differentiation **75**(7): 580-91.
68. McCulloch, E. A. and J. E. Till (2005). "Perspectives on the properties of stem cells." Nat Med **11**(10): 1026-8.
69. Morris, S. W., M. N. Kirstein, M. B. Valentine, K. G. Dittmer, D. N. Shapiro, D. L. Saltman and A. T. Look (1994). "Fusion of a kinase gene, ALK, to a nucleolar protein gene, NPM, in non-Hodgkin's lymphoma." Science **263**(5151): 1281-4.

70. Morrison, S. J., P. M. White, C. Zock and D. J. Anderson (1999).
"Prospective identification, isolation by flow cytometry, and in vivo self-renewal of multipotent mammalian neural crest stem cells." Cell **96**(5): 737-49.
71. Moteji, A., J. Fujimoto, M. Kotani, H. Sakuraba and T. Yamamoto (2004).
"ALK receptor tyrosine kinase promotes cell growth and neurite outgrowth." J Cell Sci **117**: 3319-3329.
72. Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." J Immunol Methods **65**(1-2): 55-63.
73. Mosse, Y. P., M. Laudenslager, L. Longo, K. A. Cole, A. Wood, E. F. Attiyeh, M. J. Laquaglia, R. Sennett, J. E. Lynch, P. Perri, G. Laureys, F. Speleman, C. Kim, C. Hou, H. Hakonarson, A. Torkamani, N. J. Schork, G. M. Brodeur, G. P. Tonini, E. Rappaport, M. Devoto and J. M. Maris (2008).
"Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene." Nature **455**(7215): 930-5.
74. Mülhardt, C. (2003). "Molekularbiologie / Genomics."
75. Murphy, M., O. Bernard, K. Reid and P. F. Bartlett (1991). "Cell lines derived from mouse neural crest are representative of cells at various stages of differentiation." J Neurobiol **22**(5): 522-35.
76. Nakagawara, A. (2001). "Trk receptor tyrosine kinases: a bridge between cancer and neural development." Cancer Lett **169**(2): 107-14.
77. Nakagawara, A. (2004). "Neural crest development and neuroblastoma: the genetic and biological link." Prog Brain Res **146**: 233-42.
78. Nakagawara, A., M. Arima-Nakagawara, N. J. Scavarda, C. G. Azar, A. B. Cantor and G. M. Brodeur (1993). "Association between high levels of expression of the TRK gene and favorable outcome in human neuroblastoma." N Engl J Med **328**(12): 847-54.
79. Nakagawara, A., C. G. Azar, N. J. Scavarda and G. M. Brodeur (1994).
"Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas." Mol Cell Biol **14**(1): 759-67.
80. Nowell, P. C. and D. A. Hungerford (1960). "Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes." J Natl Cancer Inst **25**: 85-109.
81. Obinata, M. (1997). "Conditionally immortalized cell lines with differentiated functions established from temperature-sensitive T-antigen transgenic mice." Genes Cells **2**(4): 235-44.
82. Pajtler K., A. Bohrer, J. Maurer, H. Schorle, A. Schramm, A. Eggert and J. H. Schulte (2010). "Production of chick embryo extract for the cultivation of murine neural crest stem cells." J Vis Exp (45).
83. Paratore, C., D. E. Goerich, U. Suter, M. Wegner and L. Sommer (2001).
"Survival and glial fate acquisition of neural crest cells are regulated by an interplay between the transcription factor Sox10 and extrinsic combinatorial signaling." Development **128**(20): 3949-61.
84. Pizzo, P. A. and D. G. Poplack (2011). Principles and Practice of Pediatric Oncology, 6th Edition, Lippincott Williams & Wilkins (LWW).
85. Rao, M. S. and D. J. Anderson (1997). "Immortalization and controlled in vitro differentiation of murine multipotent neural crest stem cells." J Neurobiol **32**(7): 722-46.

86. Riggi, N., M. L. Suva, D. Suva, L. Cironi, P. Provero, S. Tercier, J. M. Joseph, J. C. Stehle, K. Baumer, V. Kindler and I. Stamenkovic (2008). "EWS-FLI-1 expression triggers a Ewing's sarcoma initiation program in primary human mesenchymal stem cells." Cancer Res **68**(7): 2176-85.
87. Schilling, F. H., C. Spix, F. Berthold, R. Erttmann, N. Fehse, B. Hero, G. Klein, J. Sander, K. Schwarz, J. Treuner, U. Zorn and J. Michaelis (2002). "Neuroblastoma screening at one year of age." N Engl J Med **346**(14): 1047-53.
88. Schonherr, C., H. L. Yang, M. Vigny, R. H. Palmer and B. Hallberg (2010). "Anaplastic lymphoma kinase activates the small GTPase Rap1 via the Rap1-specific GEF C3G in both neuroblastoma and PC12 cells." Oncogene **29**: 2817–2830.
89. Schramm, A., J. Koster, T. Marschall, M. Martin, M. Schwermer, K. Fielitz, G. Buchel, M. Barann, D. Esser, P. Rosenstiel, S. Rahmann, A. Eggert and J. H. Schulte (2013). "Next-generation RNA sequencing reveals differential expression of MYCN target genes and suggests the mTOR pathway as a promising therapy target in MYCN-amplified neuroblastoma." Int J Cancer **132**(3): E106-15.
90. Schulte, J. H., S. Lindner, A. Bohrer, J. Maurer, K. De Preter, S. Lefever, L. Heukamp, S. Schulte, J. Molenaar, R. Versteeg, T. Thor, A. Kunkele, J. Vandesompele, F. Speleman, H. Schorle, A. Eggert and A. Schramm (2012). "MYCN and ALKF1174L are sufficient to drive neuroblastoma development from neural crest progenitor cells." Oncogene **32**(8): 1059-65.
91. Schulte, J. H., F. Pentek, W. Hartmann, A. Schramm, N. Friedrichs, I. Ora, J. Koster, R. Versteeg, J. Kirfel, R. Buettner and A. Eggert (2009). "The low-affinity neurotrophin receptor, p75, is upregulated in ganglioneuroblastoma / ganglioneuroma and reduces tumorigenicity of neuroblastoma cells in vivo." Int J Cancer **124**(10): 2488-94.
92. Schwab, M. (2002). "Amplified MYCN in human neuroblastoma: paradigm for the translation of molecular genetics to clinical oncology." Ann N Y Acad Sci **963**: 63-73.
93. Schwab, M., K. Alitalo, K. H. Klempnauer, H. E. Varmus, J. M. Bishop, F. Gilbert, G. Brodeur, M. Goldstein and J. Trent (1983). "Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour." Nature **305**(5931): 245-8.
94. Schwab, M., F. Westermann, B. Hero and F. Berthold (2003). "Neuroblastoma: biology and molecular and chromosomal pathology." Lancet Oncol **4**(8): 472-80.
95. Seeger, R. C., G. M. Brodeur, H. Sather, A. Dalton, S. E. Siegel, K. Y. Wong and D. Hammond (1985). "Association of multiple copies of the N-myc oncogene with rapid progression of neuroblastomas." N Engl J Med **313**(18): 1111-6.
96. Shimada, H., I. M. Ambros, L. P. Dehner, J. Hata, V. V. Joshi, B. Roald, D. O. Stram, R. B. Gerbing, J. N. Lukens, K. K. Matthay and R. P. Castleberry (1999). "The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system)." Cancer **86**(2): 364-72.

97. Shimada, H., J. Chatten, W. A. Newton, Jr., N. Sachs, A. B. Hamoudi, T. Chiba, H. B. Marsden and K. Misugi (1984). "Histopathologic prognostic factors in neuroblastic tumors: definition of subtypes of ganglioneuroblastoma and an age-linked classification of neuroblastomas." *J Natl Cancer Inst* **73**(2): 405-16.
98. Shimada, H., A. Nakagawa, J. Peters, H. Wang, P. K. Wakamatsu, J. N. Lukens, K. K. Matthay, S. E. Siegel and R. C. Seeger (2004). "TrkA expression in peripheral neuroblastic tumors: prognostic significance and biological relevance." *Cancer* **101**(8): 1873-81.
99. Sieber-Blum, M. (2000). "Factors controlling lineage specification in the neural crest." *Int Rev Cytol* **197**: 1-33.
100. Sieber-Blum, M. and A. M. Cohen (1980). "Clonal analysis of quail neural crest cells: they are pluripotent and differentiate in vitro in the absence of noncrest cells." *Dev Biol* **80**(1): 96-106.
101. Sieber-Blum, M., K. Ito, M. K. Richardson, C. J. Langtimm and R. S. Duff (1993). "Distribution of pluripotent neural crest cells in the embryo and the role of brain-derived neurotrophic factor in the commitment to the primary sensory neuron lineage." *J Neurobiol* **24**(2): 173-84.
102. Singh, S. K., I. D. Clarke, M. Terasaki, V. E. Bonn, C. Hawkins, J. Squire and P. B. Dirks (2003). "Identification of a cancer stem cell in human brain tumors." *Cancer Res* **63**(18): 5821-8.
103. Singh, S. K., C. Hawkins, I. D. Clarke, J. A. Squire, J. Bayani, T. Hide, R. M. Henkelman, M. D. Cusimano and P. B. Dirks (2004). "Identification of human brain tumour initiating cells." *Nature* **432**(7015): 396-401.
104. Soda, M., Y. L. Choi, M. Enomoto, S. Takada, Y. Yamashita, S. Ishikawa, S. Fujiwara, H. Watanabe, K. Kurashina, H. Hatanaka, M. Bando, S. Ohno, Y. Ishikawa, H. Aburatani, T. Niki, Y. Sohara, Y. Sugiyama and H. Mano (2007). "Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer." *Nature* **448**(7153): 561-6.
105. Sommer, L., N. Shah, M. Rao and D. J. Anderson (1995). "The cellular function of MASH1 in autonomic neurogenesis." *Neuron* **15**(6): 1245-58.
106. Soucek, L., J. Whitfield, C. P. Martins, A. J. Finch, D. J. Murphy, N. M. Sodir, A. N. Karnezis, L. B. Swigart, S. Nasi and G. I. Evan (2008). "Modelling Myc inhibition as a cancer therapy." *Nature* **455**(7213): 679-83.
107. Souttou, B., NB. Carvalho, D. Raulais and M. Vigny (2001). "Activation of anaplastic lymphoma kinase receptor tyrosine kinase induces neuronal differentiation through the mitogen-activated protein kinase pathway." *J Biol Chem* **276**: 9526-9531.
108. Stemple, D. L. and D. J. Anderson (1992). "Isolation of a stem cell for neurons and glia from the mammalian neural crest." *Cell* **71**(6): 973-85.
109. Swartling, F. J., M. R. Grimmer, C. S. Hackett, P. A. Northcott, Q. W. Fan, D. D. Goldenberg, J. Lau, S. Masic, K. Nguyen, S. Yakovenko, X. N. Zhe, H. C. Gilmer, R. Collins, M. Nagaoka, J. J. Phillips, R. B. Jenkins, T. Tihan, S. R. Vandenberg, C. D. James, K. Tanaka, M. D. Taylor, W. A. Weiss and L. Chesler (2010). "Pleiotropic role for MYCN in medulloblastoma." *Genes Dev* **24**(10): 1059-72.

110. Sweetser, D. A., R. P. Kapur, G. J. Froelick, K. E. Kafer and R. D. Palmiter (1997). "Oncogenesis and altered differentiation induced by activated Ras in neuroblasts of transgenic mice." Oncogene **15**(23): 2783-94.
111. Takeda, O., M. Handa, T. Uehara, N. Maseki, A. Sakashita, M. Sakurai, N. Kanda, Y. Arai and Y. Kaneko (1996). "An increased NM23H1 copy number may be a poor prognostic factor independent of LOH on 1p in neuroblastomas." Br J Cancer **74**(10): 1620-6.
112. Tang, X. X., H. Zhao, B. Kung, D. Y. Kim, S. L. Hicks, S. L. Cohn, N. K. Cheung, R. C. Seeger, A. E. Evans and N. Ikegaki (2006). "The MYCN enigma: significance of MYCN expression in neuroblastoma." Cancer Res **66**(5): 2826-33.
113. Thompson, P. M., B. A. Seifried, S. K. Kyemba, S. J. Jensen, C. Guo, J. M. Maris, G. M. Brodeur, D. O. Stram, R. C. Seeger, R. Gerbing, K. K. Matthay, T. C. Matise and P. S. White (2001). "Loss of heterozygosity for chromosome 14q in neuroblastoma." Med Pediatr Oncol **36**(1): 28-31.
114. Trentin, A., C. Glavieux-Pardanaud, N. M. Le Douarin and E. Dupin (2004). "Self-renewal capacity is a widespread property of various types of neural crest precursor cells." Proc Natl Acad Sci USA **101**(13): 4495-500.
115. Virchow, R. (1865). Die Krankhaften Geschwulste: Hyperplasie der Zorbel und der Nebenniere. Berlin, August Hirschwald **11**: 149-150.
116. von Bueren, A. O., T. Shalaby, J. Rajtarova, D. Stearns, C. G. Eberhart, L. Helson, A. Arcaro and M. A. Grotzer (2007). "Anti-proliferative activity of the quassinoid NBT-272 in childhood medulloblastoma cells." BMC Cancer **7**: 19.
117. Weiss, W. A., K. Aldape, G. Mohapatra, B. G. Feuerstein and J. M. Bishop (1997). "Targeted expression of MYCN causes neuroblastoma in transgenic mice." EMBO J **16**(11): 2985-95.
118. Wellstein, A. (2012). "ALK receptor activation, ligands and therapeutic targeting in glioblastoma and in other cancers." Front Oncol **2**: 192.
119. Weston, J., A. (1991). "Sequential segregation and fate of developmentally restricted intermediate cell populations in the neural crest lineage." Curr Top Dev Biol **25**: 133-53.
120. Wiemels, J. L., G. Cazzaniga, M. Daniotti, O. B. Eden, G. M. Addison, G. Masera, V. Saha, A. Biondi and M. F. Greaves (1999). "Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children." Lancet **354**(9189): 1499-503.
121. Wiemels, J. L., A. M. Ford, E. R. Van Wering, A. Postma and M. Greaves (1999). "Protracted and variable latency of acute lymphoblastic leukemia after TEL-AML1 gene fusion in utero." Blood **94**(3): 1057-62.
122. Wiemels, J. L. and M. Greaves (1999). "Structure and possible mechanisms of TEL-AML1 gene fusions in childhood acute lymphoblastic leukemia." Cancer Res **59**(16): 4075-82.
123. Wiemels, J. L., A. Pagnamenta, G. M. Taylor, O. B. Eden, F. E. Alexander and M. F. Greaves (1999). "A lack of a functional NAD(P)H:quinone oxidoreductase allele is selectively associated with pediatric leukemias that have MLL fusions. United Kingdom Childhood Cancer Study Investigators." Cancer Res **59**(16): 4095-9.

124. Woods, W. G., R. N. Gao, J. J. Shuster, L. L. Robison, M. Bernstein, S. Weitzman, G. Bunin, I. Levy, J. Brossard, G. Dougherty, M. Tuchman and B. Lemieux (2002). "Screening of infants and mortality due to neuroblastoma." N Engl J Med **346**(14): 1041-6.
125. Wright, J. H. (1910). J Exp Med **12**(4): 556-61.
126. Zambrowicz, B. P., A. Imamoto, S. Fiering, L. A. Herzenberg, W. G. Kerr and P. Soriano (1997). "Disruption of overlapping transcripts in the ROSA beta geo 26 gene trap strain leads to widespread expression of beta-galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells." Proc Natl Acad Sci USA **94**(8): 3789-94.
127. Zender, L. and S. Kubicka (2008). "Molecular pathogenesis and targeted therapy of hepatocellular carcinoma." Onkologie **31**(10): 550-5.

Abkürzungsverzeichnis

MIBG	Metaiodobenzylguanidin
PNET	Peripherer Neuroektodermaler Tumor
INPC	International Neuroblastoma Pathology Classification
LOH	Loss of Heterozygosity
LDH	Laktatdehydrogenase
NSE	Neuron-spezifische Enolase
DNA	Desoxyribonucleid acid
Trk	Tropomyosin-related Kinase
ALK	anaplastische Lymphomkinase
MAPK	Mitogen-activated proteinkinase
RAP1	Ras-related protein 1
INSS	International Neuroblastoma Staging System
COG	Childrens' Oncology Group
GPOH	Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie & Hämatologie
NLSZ	Neuralleistenstammzellen
MONC-1	Mouse neural crest
4-OHT	4-Hydroxytamoxifen
BMP2	Bone morphogenetic protein 2
SMA	Smooth muscle actin
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
GAPDH	Glyzerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
RT-PCR	Real-time PCR
RNA	Ribonucleid acid
NB	Neuroblastom
b-FGF	basic fibroblast growth factor
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
EGF	Epidermal growth factor
FCS	Fetal Calf Serum
BSA	Bovine Serum Albumin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
SDS	Sodiumdesoxycholat
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
HEE	Hühnerembryonenextrakt
NMRI	Naval medical research institute
PCR	Polymerase chain reaction
EGFP	enhanced green fluorescent protein
RT	reverse Transkription
cDNA	complementary desoxyribonucleid acid
MCS	Multiple cloning site
GOI	Gene of interest
LTR	Long term repetas
Pgk	Phospho glycerat kinase
HE	Hämatoxylin-Eosin

Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

Tabelle 1	Stadieneinteilung neuroblastischer Tumoren
Tabelle 2	Biologische Erscheinungsformen des Neuroblastoms
Tabelle 3	Tumorigenität <i>in vivo</i> von JoMa1-MYCN und JoMa1-ALK ^{F1174L} im Vergleich zu JoMa1 und JoMa1-EGFP
Tabelle 4	Todeszeitpunkte der immundefizienten Nacktmäuse nach Transplantation von JoMa1-MYCN und JoMa1-ALK ^{F1174L}
Tabelle 5	Zuordnung der induzierten Maustumoren zu den transplantierten Neuralleistenstammzellen sowie Zuordnung der etablierten NB-Zelllinien zu den induzierten Maustumoren
Tabelle 6a+6b	Todeszeitpunkte der immundefizienten Nacktmäuse nach Retransplantation der NB-Zelllinien JoMa1-MYCN-T1 bis JoMa1-T4, bzw. JoMa1-ALK ^{F1174L} -T1 und JoMa1-ALK ^{F1174L} -T2
Tabelle 7	Zuordnung der etablierten NB-Zelllinien zu den primären Maustumoren, aus denen sie isoliert wurden, sowie Zuordnung der durch serielle Transplantation induzierten Tumoren zu den etablierten retransplantierten NB-Zelllinien
Abbildung 1	Modell der Neuroblastomentstehung
Abbildung 2	Modell der Generation der zellulären Heterogenität in einem Tumor
Abbildung 3	Differenzierungspotential von Neuralleistenstammzellen in die verschiedenen Derivate der Neuralleiste
Abbildung 4	Das JoMa1 Neuralleistenstammzell Modell
Abbildung 5	Neurogenese in JoMa1 Neuralleistenstammzellen
Abbildung 6a+6b	MTT-Proliferationsassays zum Vergleich der Auswirkung von extern gekauftem Hühnerembryonenextrakt (HEE), in Bonn hergestelltem HEE und selbst hergestelltem HEE auf das Proliferationsverhalten von JoMa1 NLSZ
Abbildung 7	Detaillierte Vektorkarte von pMSCVpuro-attR
Abbildung 8	Fluoreszenzmikroskopische Photodokumentation der funktionellen Expression von EGFP in transfizierten JoMa1-EGFP zum Nachweis der Transfizierbarkeit der JoMa1 NLSZ mit Hilfe des Vektors pMSCVpuro-EGFP
Abbildung 9	Semiquantitative Real-Time zum Nachweis der ektopen Expression von MYCN in JoMa1-MYCN auf mRNA Ebene
Abbildung 10	PCR zum Nachweis der stabilen Integration des Vektors pMSCVpuro-attR in JoMa1 NLSZ durch Nachweis der vektorspezifischen Sequenz <i>pgk</i>
Abbildung 11	Semiquantitative RT-PCR zur Bestätigung der Expression von MYCN in JoMa1-MYCN sowie der Expression von ALK ^{F1174L} in JoMa1-ALK ^{F1174L} auf mRNA Ebene

Abbildung 12	Mikroskopische Photodokumentation der <i>in vitro</i> Immortalisierung von JoMa1-MYCN durch MYCN und JoMa1-ALK ^{F1174L} durch ALK ^{F1174L}
Abbildung 13	MTT-Viabilityassay von JoMa1-EGFP, JoMa1-MYCN und JoMa1-ALK ^{F1174L} zur Untersuchung der <i>in vitro</i> Immortalisierung der JoMa1 NLSZ durch MYCN und ALK ^{F1174L}
Abbildung 14	Photodokumentation der transplantierten immundefizienten Nacktmäuse zum Nachweis der <i>in vivo</i> Tumorigenität von JoMa1-MYCN
Abbildung 15	Kaplan-Meyer-Kurve zur Darstellung des Überlebens von immundefizienten Nacktmäusen in Abhängigkeit der transplantierten Zellen JoMa1, JoMa1-EGFP, JoMa1-MYCN und JoMa1-ALK ^{F1174L}
Abbildung 16	PCR zum Nachweis der Tumorigenität von JoMa1-MYCN und JoMa1-ALK ^{F1174L} <i>in vivo</i> mittels Nachweis der für den Vektor pMSCVpuro-attR spezifischen Sequenz <i>pgk</i>
Abbildung 17	Mikroskopische Photodokumentation der Ähnlichkeit der histopathologischen Merkmale der durch JoMa1-MYCN induzierten Tumoren und humaner Neuroblastome
Abbildung 18	Quantitative Echtzeit-PCR zum Vergleich der Expression von MYCN in parenteralen JoMa1 Zellen, JoMa1-MYCN und den experimentellen Tumoren
Abbildung 19	Quantitative Echtzeit-PCR zum Vergleich der Expression von ALK ^{F1174} in parenteralen JoMa1 Zellen, JoMa1-ALK ^{F1174L} und den experimentellen Tumoren
Abbildung 20	Mikroskopische Photodokumentation der phänotypischen Ähnlichkeiten zwischen NB-Zelllinien isoliert aus durch JoMa1-MYCN induzierten experimentellen Tumoren und NB-Zelllinien isoliert aus primären humanen Neuroblastomen
Abbildung 21	Zunahme der Tumorigenität bei serieller Transplantation von NB-Zelllinien abgeleitet von JoMa1-MYCN und JoMa1-ALK ^{F1174L}
Abbildung 22	Verstärktes Tumorstadium der retransplantierten Tumoren abgeleitet von NB-Zelllinien, isoliert aus den durch JoMa1-MYCN induzierten Tumoren
Abbildung 23	Erhöhte Tumorigenität von JoMa1-MYCN nach serieller Transplantation
Abbildung 24	Impedanzmessung zur Untersuchung der Wirkung des MYCN-Inhibitors NBT-272 auf die etablierten NB-Zelllinien mT1-MYCN und mT2-MYCN

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt folgenden Personen:

Herrn Univ-Prof. Dr. med. J. H. Schulte danke ich an erster Stelle dafür, mir ermöglicht zu haben, dieses interessante Projekt durchführen zu können. Ich danke ihm für seine ständige Unterstützung - im Sinne von Anleitung, Förderung und Diskussion - sowie für das mir stets entgegengebrachte Vertrauen.

Frau Univ-Prof. Dr. med. A. Eggert danke ich dafür, es mir ermöglicht zu haben, in ihrer Arbeitsgruppe und den Räumlichkeiten derselben in der Kinderklinik die Experimente durchführen zu können, die im Rahmen dieser Arbeit anfielen. Auch danke ich ihr für die Möglichkeit, an diversen Tagungen der Kind-Philipp-Stiftung für Leukämieforschung in Wilsede teilnehmen und dort meine Ergebnisse in Form von Vorträgen präsentieren zu dürfen.

Herrn Dipl. Biol. S. Lindner möchte ich für die Zusammenarbeit bei der Durchführung der weiterführenden Experimente mit dem JoMa1-Neuroblastom Modell danken.

Herrn Dr. rer. nat. J. Maurer danke ich dafür, mich - unter anderem in den Räumlichkeiten von Uni-Prof. Jaeger und Univ-Prof. Schorle im Institut für Pathologie der Universität Bonn - in die Herstellung von Hühnerembryonenextrakt sowie die Kultivierung von JoMa1-Neuralleistenstammzellen eingearbeitet zu haben.

Herrn M. Pajtler, Herrn Dr. med. K. Pajtler, sowie insbesondere auch Herrn R. G. Bohrer danke ich für die gute Zusammenarbeit zur Verwirklichung unserer gemeinsamen Erstveröffentlichung in Form eines Videobeitrags im Journal of Vizualized Experiments (JoVE) im Jahre 2010.

Weiterhin danke ich auch dem gesamten Team des Labors für Pädiatrische Hämatologie und Onkologie, sowie der AG Pädiatrisch Onkologische Forschung II: Herrn Univ-PD Dr. rer. nat. A. Schramm, Herrn Dipl. Biol. H. Stephan, Frau Dr. rer. nat. K. Astrahantseff, Frau Dr. S. Schulte geb. Schlierf, Herrn Dr. F. Pentek, , Frau E. Mahlow, Frau S. Dreesmann, Frau M. Baumann, Frau A. Odersky und Frau S. Freund.

Herzlichen Dank!!!

Erklärung zum Beitrag zu den zugrundeliegenden Arbeiten

- A. MYCN and ALKF1174L are sufficient to drive neuroblastoma development from neural crest progenitor cells. (Schulte et al., Oncogene 2012)**

Der Beitrag von Frau Bohrer umfaßt die Kultur und Transfektion der JoMa1 Zellen mit den Onkogenen MYCN und ALKF^{1174L}, sowie - teils in Zusammenarbeit mit Sven Lindner - die Charakterisierung der JoMa1, JoMa1-EGFP, JoMa1-MYCN und JoMa1-ALK^{F1174L} Zellen *in vitro*. Frau Bohrer hat darüber hinaus die Graft-Experimente mit den JoMa1 Zellen und ihren o.g. Derivaten in Mäusen durchgeführt, und auch die Etablierung der Zelllinien aus den Tumoren durchgeführt. Auch die anschließende Re-Transplantation und Charakterisierung der etablierten Zelllinien inkl. der Behandlung mit dem MYCN Inhibitor NBT-272 wurden von Frau Bohrer in Zusammenarbeit mit Sven Lindner durchgeführt. Frau Bohrer hat darüber hinaus alle statistischen Auswertungen durchgeführt. Das gesamte Manuskript inklusive der Erstversion des Manuskripts wurden von Frau Bohrer geschrieben.

- B. Production of chick embryo extract for the cultivation of murine neural crest stem cells. (Pajtler*, Bohrer* et al., J Vis Exp. 2010, *beide Autoren sind gleichermaßen Erstautoren dieser Veröffentlichung)**

Frau Bohrer hat das Protokoll zur Herstellung von CEE im Rahmen ihrer Dissertation optimiert. Die im Rahmen der oben genannten Veröffentlichung durchgeführten Experimente wurden von Frau Bohrer durchgeführt. An der Planung und Erstellung der Publikation war Frau Bohrer maßgeblich beteiligt und ist dementsprechend eine der beiden Erstautoren dieser Publikation.

Anna M. Bohrer

Prof. Dr. J.H. Schulte